



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

“Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de arreglo de diodos para evaluar la estabilidad de resveratrol en una formulación parenteral”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADA EN FARMACIA

P R E S E N T A

ESMERALDA MOTA LUGO

Asesora:

Dra. Mariana Dolores Hernández

Coasesora:

Dra. Raquel López Arellano

Cuautitlán Izcalli, Estado de México; 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

DEPARTAMENTO DE
EXÁMENES PROFESIONALES

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: **Trabajo de Tesis.**

Desarrollo y validación de un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de arreglo de diodos para evaluar la estabilidad de resveratrol en una formulación parental.

Que presenta la pasante: **Esmeralda Mota Lugo**

Con número de cuenta: **415091682** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Farmacia**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO.**

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 22 de Agosto de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	<u>Q.F.B. Elia Granados Enríquez</u>	
VOCAL	<u>M.C. Elvia Adriana Morales Hipolito</u>	
SECRETARIO	<u>Dra. Mariana Dolores Hernández</u>	
1er. SUPLENTE	<u>Dr. Roberto Díaz Torres</u>	
2do. SUPLENTE	<u>M.C. Miriam Aide Castillo Rodríguez</u>	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).



El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Ensayos de Desarrollo Farmacéuticos (LEDEFAR), ubicado en el laboratorio 5 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria, Campo 4, FES Cuautitlán.



Agradecimientos

A dios, por darme los mejores regalos: la vida, salud y amor de mi familia y amigos.

A mis padres, Avelina Lugo y Marco A. Mota, por su amor y apoyo incondicional, por enseñarme a ser una persona valiente y por todo lo que siempre hacen por mi bienestar, los amo.

A mis hermanos, Rubí, Israel y Antonio; por la gran hermandad y cariño, los amo.

A Samuel, por su cariño, amistad y comprensión, por estar siempre ahí, en momentos felices y difíciles, por llenar mi vida de maravillosos colores, te amo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, por abrirme las puertas y brindarme un segundo hogar, por todo lo que he aprendido en ella y por permitirme ser orgullosamente Universitaria.

A la Dra. Raquel López Arellano, por permitirme ser parte de su grupo de investigación, LEDEFAR, por la confianza, apoyo y conocimientos brindados.

A la Dra. Mariana Dolores Hernández, por su extraordinaria asesoría, conocimiento, tiempo y disposición incondicional, ya que sin su apoyo no hubiera sido fácil lograr este trabajo.

A la M. C. Adriana Morales Hipólito, por su conocimiento y apoyo brindado para la realización de este trabajo.

A Iris Blanco, por su amistad, paciencia y su apoyo en la realización de este trabajo.

A mis sinodales, la Q.F.B. Elia Granados, a la M. C. Adriana Morales, al Dr. Roberto Díaz y a la Dra. Miriam Castillo por el tiempo dedicado para revisar y realizar sugerencias para el mejoramiento del presente trabajo.

¡ G R A C I A S !



Índice

	Pág.
1. Introducción	1
2. Marco teórico	3
2.1. Generalidades de Resveratrol	3
2.2. Conceptos de estabilidad.....	10
2.3. Generalidades de métodos analíticos indicativos de estabilidad	13
2.4. Conceptos de cromatografía	16
2.5. Generalidades de la cromatografía líquida de alta resolución	22
2.6. Análisis Cuantitativo.....	35
2.7. Metodologías reportadas	36
2.8. Validación de Métodos Analíticos.....	37
3. Hipótesis	42
4. Objetivos.....	43
4.1. Objetivo general.....	43
4.2. Objetivos específicos	43
5. Desarrollo experimental.....	44
5.1. Reactivos, sustancias, instrumentos y equipos	46
5.2. Desarrollo del método analítico	48
5.3. Validación del método analítico	51
5.4. Ensayo de estabilidad.....	56
6. Resultados y discusión	62



6.1.	Desarrollo del método analítico	62
6.2.	Validación del método analítico	70
6.3.	Ensayo de estabilidad.....	86
7.	Conclusiones	105
8.	Aplicación.....	107
9.	Perspectivas.....	107
10.	Referencias.....	108
11.	Anexos	113
11.1.	Preparación de soluciones	114
11.2.	Fórmulas.....	118
11.3.	Resultados de selección de volumen de inyección.....	119
11.4.	Resultados de la proporción de la fase móvil y flujo de inyección.....	120
11.5.	Resultados de la adecuabilidad	121
11.6.	Resultados de la linealidad del sistema	122
11.7.	Resultados de precisión y exactitud	123
11.8.	Resultados de linealidad del método.....	124
11.9.	Resultados de repetibilidad y reproducibilidad.....	125
11.1.	Resultados de robustez	126
11.2.	Resultados del ensayo de estabilidad.....	128



Índice de figuras

	Pág.
• <i>Figura 1. Estructura química de trans-resveratrol</i> ³⁵	3
• <i>Figura 2. Espectros de absorción UV/VIS de resveratrol</i> ²⁵	4
• <i>Figura 3. Propuesta de ruta de degradación de resveratrol</i> ³⁵	5
• <i>Figura 4. Los espectros y cromatogramas UV/Visible, HPLC y UPLC de t-RSV estándar</i> ⁴⁴ ..	6
• <i>Figura 5. Degradación del espectro de absorción de t-RSV causada por luz UV, $\lambda=365\text{ nm}$</i> ¹³	7
• <i>Figura 6. Esquemas de condiciones de estrés utilizadas para la degradación de la sustancia y el producto farmacológico</i> ³	14
• <i>Figura 7. Representación de la técnica de cromatografía</i> ¹⁶	16
• <i>Figura 8. Proceso de cromatografía de adsorción</i> ¹⁵	18
• <i>Figura 9. Proceso de cromatografía de reparto</i> ¹⁵	18
• <i>Figura 10. Proceso de cromatografía de intercambio iónico</i> ¹⁵	19
• <i>Figura 11. Proceso de cromatografía de exclusión molecular</i> ¹⁵	19
• <i>Figura 12. Proceso de cromatografía de afinidad</i> ¹⁵	19
• <i>Figura 13. Proceso de cromatografía en columna</i> ¹⁵	20
• <i>Figura 14. Cromatografía plana</i> ¹⁶	21
• <i>Figura 15. Componentes del equipo de HPLC</i> ¹⁵	23
• <i>Figura 16. Detector espectrofotométrico UV/Visible de longitud de onda variable</i> ¹⁵	28
• <i>Figura 17. Detector espectrofotométrico UV/Visible de fotodiodos</i> ¹⁵	29
• <i>Figura 18. Detector de fluorescencia</i> ¹⁵	30
• <i>Figura 19. Ejemplo de un cromatograma</i> ¹⁴	32
• <i>Figura 20. Representación de la función de Gauss</i> ¹⁴	33
• <i>Figura 21. Pico cromatográfico asimétrico</i> ¹²	34
• <i>Figura 22. Representación de cromatograma de dos picos</i> ²⁷	34
• <i>Figura 23. Diagrama metodológico.</i>	44
• <i>Figura 24. Actividades experimentales realizadas</i>	45
• <i>Figura 25. Comparación de cromatogramas de t-RSV en la selección de fase móvil.</i>	63



- *Figura 26. Comparación de espectros de t-RSV en la selección de fase móvil..... 63*
- *Figura 27. Comparación de cromatogramas de t-RSV en las columnas evaluadas. 66*
- *Figura 28. Comparación de cromatogramas de t-RSV para la elección de la fase móvil y flujo. 69*
- *Figura 29. Cromatogramas de muestras control para la determinación de selectividad..... 74*
- *Figura 30. Cromatogramas de degradación forzada por 24 horas para la determinación de selectividad. 75*
- *Figura 31. Comparación de cromatogramas de HCl 0.1 N Control y NaOH 0.1 N Control por día. 86*
- *Figura 32. Comparación de cromatogramas del grupo Peróxido control por día..... 93*
- *Figura 33. Cambio de color en las soluciones de t-RSV en condiciones de degradación forzada. 101*
- *Figura 34. Espectros de productos de degradación de t-RSV..... 104*
- *Figura 35. Comparación de cromatogramas de Formulación control por día. 129*
- *Figura 36. Comparación de cromatogramas de HCl 0.1 N por día..... 129*
- *Figura 37. Comparación de cromatogramas de NaOH 0.1 N por día..... 130*
- *Figura 38. Comparación de cromatogramas de H₂O₂ 3% por día. 131*
- *Figura 39. Comparación de cromatogramas de 4° y 25° C por día. 132*
- *Figura 40. Comparación de cromatogramas de 40° y 60° C por día. 133*
- *Figura 41. Comparación de cromatogramas de fotólisis por día 134*



Índice de tablas

	Pág.
• <i>Tabla 1. Factores que influyen en la estabilidad de un producto farmacéutico</i> ³³	11
• <i>Tabla 2. Condiciones utilizadas principalmente para estudios de degradación forzada</i> ³⁷	15
• <i>Tabla 3. Tipos de cromatografía</i> ¹⁵	17
• <i>Tabla 4. Recopilación de datos reportados de identificación de trans-resveratrol por HPLC.</i>	36
• <i>Tabla 5. Parámetros de desempeño que normalmente se validan en la industria farmacéutica.</i>	39
• <i>Tabla 6. Composición de las fases móviles utilizadas.</i>	48
• <i>Tabla 7. Variación de composición y flujo de la fase móvil.</i>	50
• <i>Tabla 8. Condiciones cromatográficas para la validación del método de trans-resveratrol.</i>	50
• <i>Tabla 9. Factores evaluados para robustez.</i>	55
• <i>Tabla 10. Condiciones del método indicativo de estabilidad.</i>	56
• <i>Tabla 11. Resultados promedios cromatográficos de selección de la fase móvil obtenidos con la columna Halo® C18.</i>	62
• <i>Tabla 12. Parámetros cromatográficos obtenidos de la comparación de columnas.</i>	65
• <i>Tabla 13. Resultados de la linealidad del volumen de inyección.</i>	66
• <i>Tabla 14. Análisis de varianza para determinar la linealidad del volumen de inyección.</i>	68
• <i>Tabla 15. Resultados para evaluar la adecuabilidad del sistema.</i>	70
• <i>Tabla 16. Resultados para evaluar el rango.</i>	71
• <i>Tabla 17. Análisis de varianza para determinar la linealidad del rango.</i>	72
• <i>Tabla 18. Resultados para evaluar la linealidad del sistema.</i>	73
• <i>Tabla 19. Análisis de varianza para determinar la linealidad del sistema.</i>	73
• <i>Tabla 20. Resultados para evaluar la precisión y exactitud.</i>	76
• <i>Tabla 21. Resultados para evaluar la linealidad del método.</i>	77
• <i>Tabla 22. Análisis de varianza para determinar la linealidad del método.</i>	79
• <i>Tabla 23. Resultados para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad.</i>	79
• <i>Tabla 24. Parámetros de la curva de calibración del sistema.</i>	80
• <i>Tabla 25. Cálculo del límite de detección y cuantificación.</i>	81



- *Tabla 26. Resultados de los factores evaluados para la robustez.* 82
- *Tabla 27. Resumen de resultados de los parámetros evaluados para la validación del método analítico indicativo de estabilidad de trans-resveratrol en una formulación parenteral.* 84
- *Tabla 28. Resultados de estabilidad en condiciones de hidrólisis.* 87
- *Tabla 29. Ecuación de Arrhenius para Formulación Control.* 89
- *Tabla 30. Ecuación de Arrhenius para HCl 0.1 N.* 91
- *Tabla 31. Ecuación de Arrhenius para NaOH 0.1 N.*..... 92
- *Tabla 32. Resultados de estabilidad en condiciones de oxidación.*..... 93
- *Tabla 33. Ecuación de Arrhenius para H₂O₂ 3%.*..... 95
- *Tabla 34. Resultados de estabilidad en condiciones térmicas.* 96
- *Tabla 35. Ecuación de Arrhenius para condición térmica.*..... 98
- *Tabla 36. Resultados de estabilidad en condiciones de fotólisis.*..... 99
- *Tabla 37. Volumen de analito requerido de t-RSV para cada solución del sistema.* 116
- *Tabla 38. Cantidad requerida de RSV materia prima para cada solución placebo adicionado.* 116
- *Tabla 39. Solución de aforo de acuerdo con el tipo de degradación.*..... 117
- *Tabla 40. Datos cromatográficos de la selección del volumen de inyección.*..... 119
- *Tabla 41. Datos cromatográficos de la selección de fase móvil y flujo.* 120
- *Tabla 42. Datos cromatográficos de la adecuabilidad del sistema.*..... 121
- *Tabla 43. Datos cromatográficos de linealidad del sistema.* 122
- *Tabla 44. Resultados del análisis de porcentaje de recuperación para la exactitud y precisión del método.*..... 123
- *Tabla 45. Resultados del análisis de porcentaje de recuperación para la linealidad del método.* 124
- *Tabla 46. Resultados del análisis de porcentaje de recuperación para la reproducibilidad y repetibilidad.*..... 125
- *Tabla 47. Resultados del análisis de porcentaje de recuperación para la robustez del método.* 126



Índice de gráficos

	Pág.
• Gráfico 1. Linealidad del volumen de inyección.	67
• Gráfico 2. Rango de t-RSV.....	71
• Gráfico 3. Linealidad del sistema de t-RSV.....	72
• Gráfico 4. Exactitud y precisión de t-RSV.....	76
• Gráfico 5. Linealidad del método de t-RSV.....	77
• Gráfico 6. Residuales obtenidos de la linealidad del método.	78
• Gráfico 7. Reproducibilidad y repetibilidad entre días y analistas.....	80
• Gráfico 8. Comparación de factores modificados para robustez del método.	83
• Gráfico 9. Comparación de líneas de regresión de cada analito de Formulación Control... ..	88
• Gráfico 10. Esquemas de la Ecuación de Arrhenius para Formulación Control.	89
• Gráfico 11. Comparación de líneas de regresión de cada analito de HCl 0.1 N.....	90
• Gráfico 12. Esquemas de la Ecuación de Arrhenius para HCl 0.1 N.	90
• Gráfico 13. Comparación de líneas de regresión de cada analito de NaOH 0.1 N.....	91
• Gráfico 14. Esquemas de la Ecuación de Arrhenius para NaOH 0.1 N.	92
• Gráfico 15. Comparación de líneas de regresión de cada analito de H ₂ O ₂ 3%.	94
• Gráfico 16. Esquemas de la Ecuación de Arrhenius para H ₂ O ₂ 3%.	94
• Gráfico 17. Comparación de líneas de regresión de cada analito en condiciones térmicas.	97
• Gráfico 18. Esquemas de la Ecuación de Arrhenius en condiciones térmicas.	97
• Gráfico 19. Comparación de líneas de regresión de cada analito en condición de fotólisis.	99



Abreviaturas

ACN	Acetonitrilo
HCl	Ácido clorhídrico
API	Ingrediente activo farmacéutico
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos en Estados Unidos de América
c-RSV	<i>Cis</i> -resveratrol
r	Coefficiente de correlación
r ²	Coefficiente de determinación
C.V.	Coefficiente de variación
ICH	Consejo Internacional para la Armonización
K	Constante
pKa	Constante de acidez
LC-MS	Cromatografía de líquidos acoplado a espectrofotometría de masas
UHPLC	Cromatografía de líquidos de ultra alta eficiencia
UPLC	Cromatografía de líquidos de ultra eficiencia
HPLC	Cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia
s	Desviación estándar
DAD	Detector de arreglo de diodos
d _i	Diferencia absoluta
STD	Estándar
K´	Factor de capacidad
RF	Fluorescencia/Fluorometría
FM	Fase móvil
FA	Formiato de amonio
F16	Formulación 16
F2	Formulación 2
g	Gramos
NaOH	Hidróxido de sodio
H ₁	Hipótesis alterna
H ₀	Hipótesis nula
h	Horas



IC (b ₀)	Intervalo de confianza para la ordenada al origen
IC (b ₁)	Intervalo de confianza para la pendiente
kg	Kilogramos
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
Lim I	Límite Inferior
Lim S	Limite Superior
λ	Longitud de onda
μg	Microgramos
μL	Microlitros
min	Minutos
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NOM	Norma Oficial Mexicana
pg	Picogramos
%	Porcentaje
pH	Potencial de hidrógeno
TP	Productos de degradación de <i>trans</i> -resveratrol
\bar{x}	Promedio
Rs	Resolución
RSV	Resveratrol
T° C	Temperatura en grados Celsius
T (K)	Temperatura en grados Kelvin
tr	Tiempo de retención
t ₉₀	Tiempo en el cual el fármaco se ha degradado el 10% de su concentración
t-RSV	<i>Trans</i> -resveratrol
UV	Ultravioleta



1. Introducción

El desarrollo de nuevas formulaciones de fármacos implica múltiples etapas para la industria farmacéutica, incluida la estabilidad, la cual es definida por la NOM-073-SSA1-2005 como la capacidad de un fármaco o un medicamento de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil, conservando sus características fisicoquímicas y biológicas entre los límites especificados de tiempo³⁰. El objetivo principal de un estudio de estabilidad es la generación de evidencia sobre la variación de la calidad de una sustancia o formulación farmacéutica con el tiempo bajo diversos factores ambientales³⁶, esto permite una mejor elección de los componentes que constituirán la formulación, el empaquetamiento adecuado, así como proporcionar las condiciones óptimas de almacenamiento y la fecha de expiración³, con el fin de asegurar la identidad, efectividad, potencia, inocuidad y pureza de los productos farmacéuticos hasta el momento de uso.

Los métodos de cuantificación aplicados a estudios de estabilidad deben ser específicos, es decir, que sean capaces de cuantificar solo la sustancia de interés, sin interferencia de algún otro componente o producto de degradación de la muestra. La cromatografía de líquidos es ampliamente usada para desarrollar métodos indicativos de estabilidad, posee ventajas sobre otros en la separación de todos los compuestos en una sola ejecución, además de permitir la fácil identificación de impurezas y productos de degradación³⁶.

El *trans*-resveratrol (t-RSV) es una fitoalexina polifenólica (3,5,4'-trihidroxiestilbeno) que se encuentra principalmente en la piel de las uvas rojas³² y en al menos 72 especies de plantas, cacahuetes, bayas y cacao, es uno de los fitoquímicos más estudiados debido a su propiedad cardioprotectora, quimiopreventiva, antioxidante, antiinflamatoria, analgésica, neuroprotectora y antienvjecimiento⁴⁰.

El t-RSV posee una baja biodisponibilidad, lo cual es un obstáculo importante para las aplicaciones biomédicas, se están realizando esfuerzos para mejorar su absorción y disminuir el metabolismo de la fase II², esto es debido a su escasa solubilidad acuosa, estabilidad limitada y extenso metabolismo hepático. La comunidad de investigación está trabajando para resolver estos



problemas mediante la formulación de nuevos sistemas de administración de medicamentos que estabilizan y protegen al t-RSV⁴⁴. Algunos estudios han afirmado que t-RSV tiene una estabilidad limitada bajo la influencia de la luz, niveles de pH básicos y la temperatura, lo que puede causar la isomerización o degradación del t-RSV⁴⁴ a *cis*-resveratrol (c-RSV). El c-RSV no se encuentra de forma natural, se puede obtener del trans-resveratrol por exposición a la luz solar, o por radiación ultravioleta (UV) a longitudes de onda de 254 nm o 366 nm⁴.

La mayoría de los métodos analíticos reportados para la identificación y cuantificación del t-RSV son en vino o estudios farmacocinéticos y se basan en cromatografía de gases, con detectores de espectrometría de masas, absorción ultravioleta en tándem y fluorimetría³². Sin embargo, algunas desventajas de estos métodos son sus costos altos en equipo y tiempos de retención largos. Por el contrario, en los informes de cromatografía de líquidos de alta resolución: ultravioleta/visible (HPLC-UV/VIS) que han tratado sobre el desarrollo de formulaciones solo abordan el desarrollo de método analítico, pero no la validación de este.

El presente trabajo de investigación busca desarrollar y validar un método confiable mediante HPLC acoplado a DAD que permita establecer la estabilidad de trans-resveratrol en una formulación parenteral ante la presencia de su isómero (*cis*-resveratrol), y/o sus productos de degradación.



2. Marco teórico

2.1. Generalidades de Resveratrol

2.1.1. Características fisicoquímicas²⁹

Número de registro CAS: 501-36-0

Nombre químico: 5-[(E)-2-(4-hidroxifenil) etenil] benceno-1,3-diol

Otros Nombres: resveratrol; *trans*-resveratrol; 3,4', 5-stilbenetriol; 3, 4',5 trihidroxiestilbeno; (E)-5-(p-Hydroxystyryl) resorcinol.

Formula condensada: C₁₄H₁₂O₃

Formula estructural:

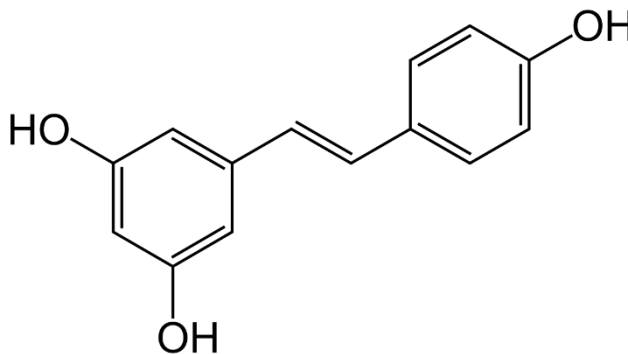


Figura 1. Estructura química de *trans*-resveratrol³⁵.

Peso molecular: 228.247 g/mol

Solubilidad: 3 mg/100 mL en agua; 65 mg/mL en etanol, 100 mg/mL dimetilsulfóxido y dimetilformamida; 100 µg/mL en solución salina tamponada con fosfato a pH 7.2.

Constante de disociación en fenol: pka 1=8.99, pka 2=9.63, pka 3=10.64

Coefficiente de partición octanol/agua: Log P=3.10



Apariencia: Sólido cristalino color blanco.

Punto de fusión: 254°C

Seguridad química: Irritante ocular, respiratorio y en piel.

Espectro de absorción UV: Máximos de UV a 218, 307, 321 nm

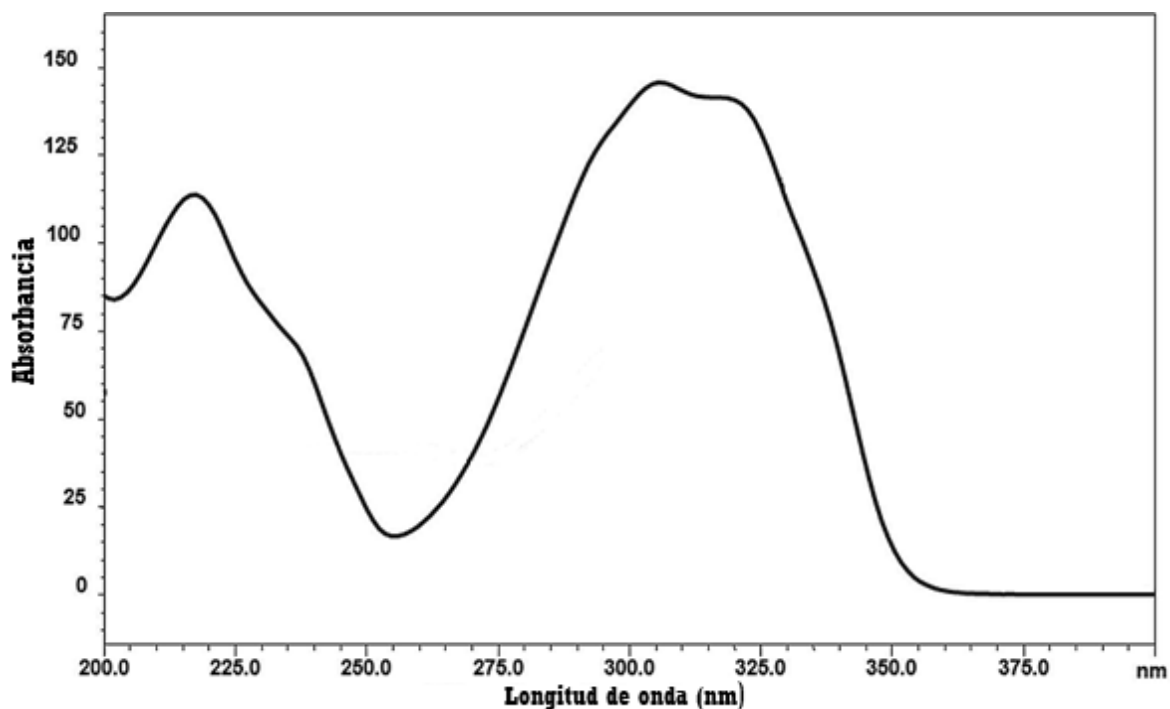


Figura 2. Espectros de absorción UV/VIS de resveratrol²⁵.

Productos de degradación: Rodríguez-Cabo et al³⁵, en 2015 investigaron sistemáticamente las rutas de transformación del *trans*-resveratrol por medio de LC-MS (Figura 3), mediante su exposición a diferentes fuentes ultravioletas (UV) y a la luz solar, proponiendo que el primer paso consiste en la isomerización entre las formas *trans* y *cis*, posteriormente ambos isómeros sufren una hidroxilación del doble enlace entre los dos anillos fenólicos que generan los TP23 y TP24, lo que podría evolucionar hacia las cetonas correspondientes (TP25 y TP26) y sus especies de escisión (TP21 y TP22). Una ruta de transformación menor es la hidroxilación directa de *trans*-resveratrol para producir piceatannol (TP41). Una ruta de reacción más favorable y competitiva implica una ciclación intramolecular, probablemente a partir del isómero *cis*-resveratrol, para



generar el 2,4,6-trihidroxifenantreno (TP31). Este compuesto evoluciona a través de otras reacciones de hidroxilación aromática que producen derivados de fenantreno adicionales como TP32 y TP33 (dos isómeros). Alternativamente, TP32 puede sufrir una reacción de oxidación y formar una diquinona (TP34) que se puede hidroxilar, probablemente en el anillo no quinona, lo que lleva a TP35 (tres isómeros) y TP36. Bajo irradiación solar, se notó una 4ª ruta de transformación. Condujo a una reorganización molecular y a la formación de un anillo de naftaleno dihidroxilado unido a un grupo butenona, la resveratróna (TP12), que probablemente surge de *cis*-resveratrol³⁵.

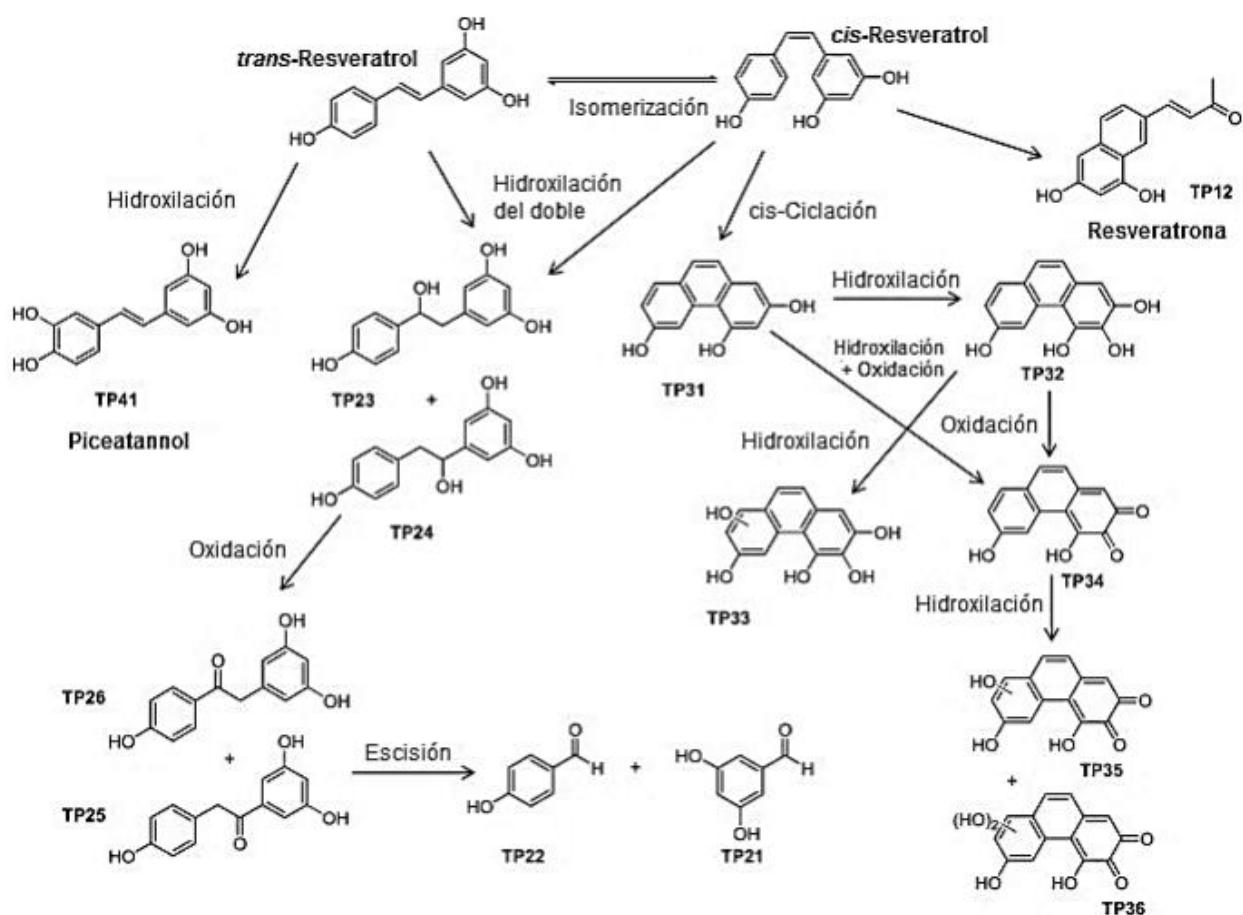


Figura 3. Propuesta de ruta de degradación de resveratrol³⁵.



El estudio de Zupančič et al, en 2015 (Figura 4), muestra que la exposición t-RSV a la luz UV de $\lambda=366$ nm, da como resultado la isomerización, en donde su máximo de absorción disminuye a 306 nm y un nuevo pico aumentó a 287 nm, representando el máximo de c-RSV en un tiempo de 46.2 horas. Por otro lado, a pH=9, causó la degradación de t-RSV, en donde su máximo de absorción también disminuyó y la absorbancia aumentó a 265 nm, mostrando dos compuestos de degradación, los cuales tuvieron menores tiempos de retención debido a su naturaleza más hidrófila y se absorbieron a 268 y 274 nm para HPLC, y a 267 y 279 nm para UPLC⁴⁴.

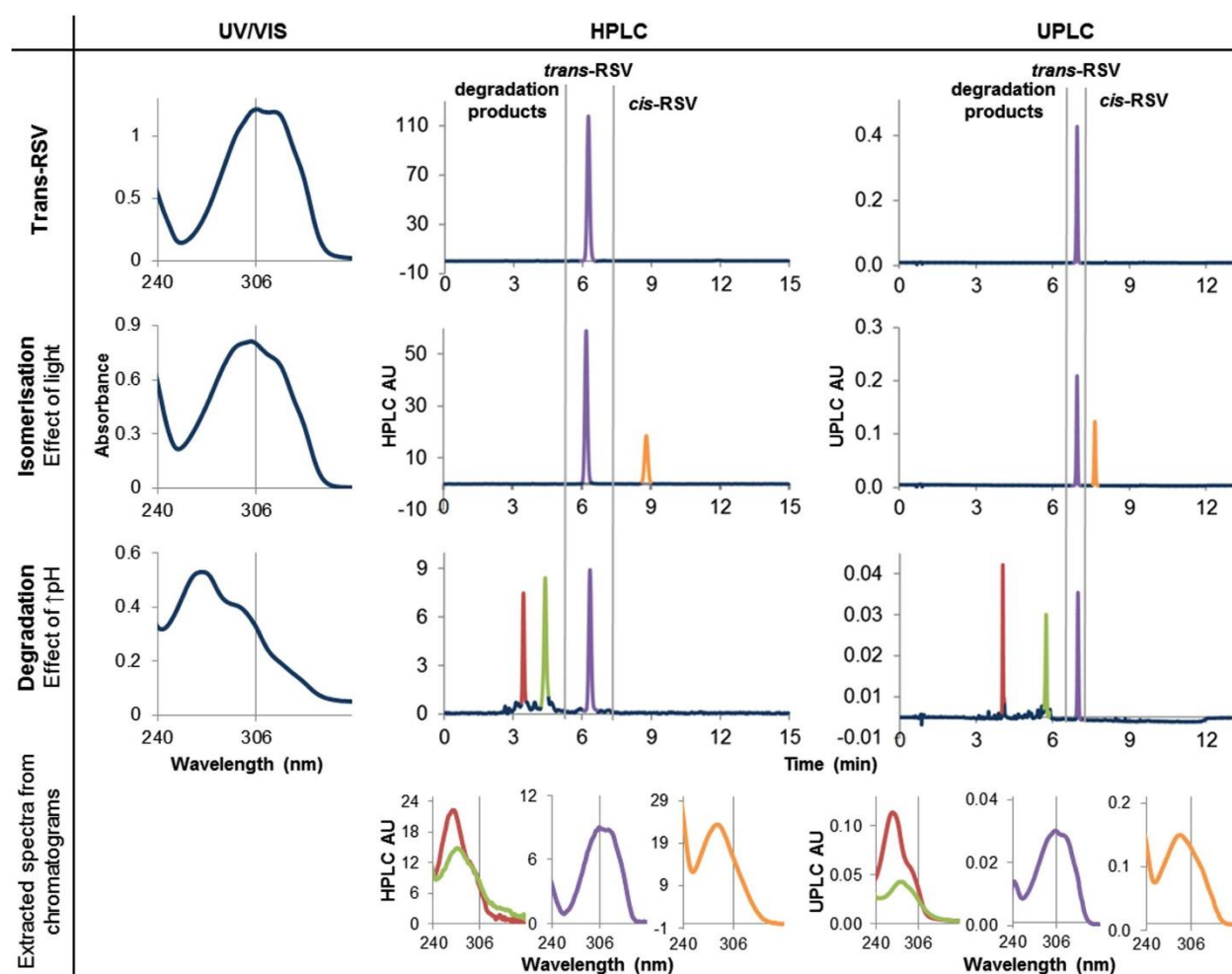


Figura 4. Los espectros y cromatogramas UV/Visible, HPLC y UPLC de t-RSV estándar⁴⁴. Los cromatogramas de HPLC y UPLC se obtuvieron a 306 nm. Los espectros de dos productos principales de degradación (rojo y verde), t-RSV (violeta) y c-RSV (naranja) se extrajeron de sus tiempos de retención (unidades de absorbancia AU)⁴⁴.

Gaspar Tosato et al¹³, en 2018 muestra como se ve afectado el espectro de t-RSV ante una radiación de luz UV, $\lambda=365$ nm, presentando cambios en el espectro de absorción de la solución hasta aproximadamente 35 minutos y después de ese tiempo el espectro permaneció invariable y bastante similar al informado para el c-RSV (Figura 5 (a)). Posterior a los 35 minutos, 25 minutos más tarde se observaron aumento de absorbancia entre 200-300 nm y en 350-450 nm, disminuyendo la concentración de t-RSV y de c-RSV, esta absorbancia fue identificada para el compuesto conocido como resveratrona, el cual es un producto de degradación de c-RSV, que solo tiene lugar en soluciones de etanol, pero no en agua¹³ (Figura 5 (b)).

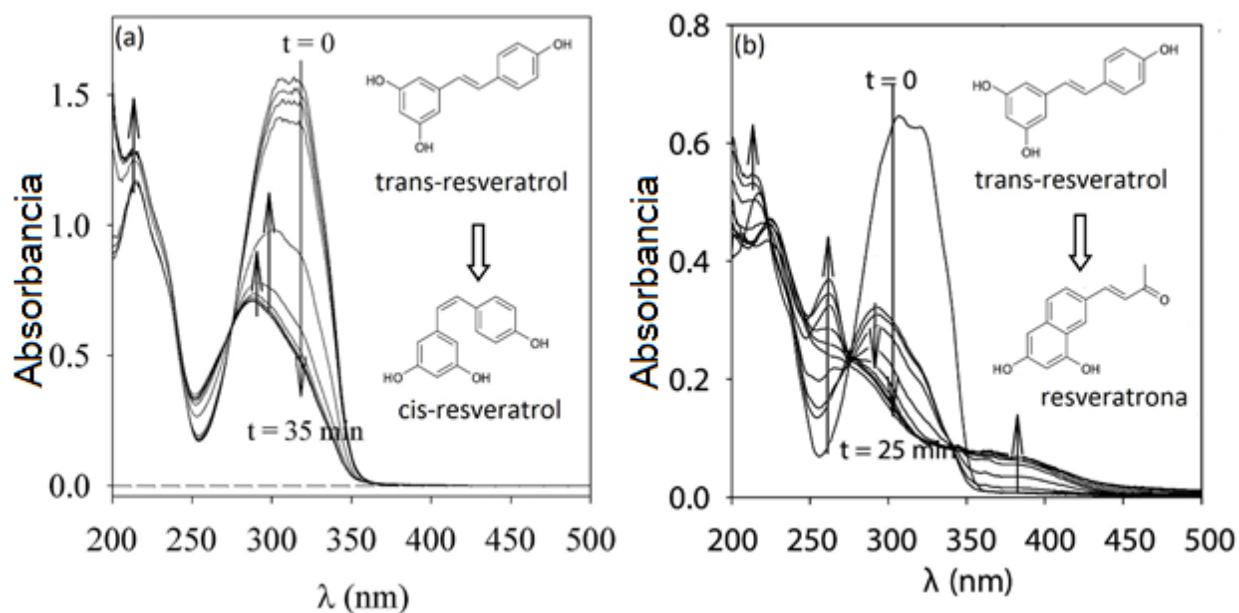


Figura 5. Degradación del espectro de absorción de t-RSV causada por luz UV, $\lambda=365$ nm¹³.



2.1.2. Características terapéuticas

Farmacología:

Varios estudios realizados en los últimos años han demostrado que el resveratrol puede prevenir o retrasar la progresión de una amplia variedad de enfermedades humanas, incluido el cáncer, las enfermedades cardiovasculares (ECV) y las lesiones isquémicas, así como para mejorar la resistencia al estrés y prolongar la vida útil³¹. Se ha demostrado que el resveratrol posee un potente efecto antioxidante contra las especies reactivas de oxígeno y el estrés oxidativo. Una de las primeras propiedades descubiertas del resveratrol fue que la inducción de enzimas antioxidantes modula el metabolismo de los lípidos al tiempo que atenúa la peroxidación hepática de los mismos, esto mediante la prevención de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad, además de tener una alta capacidad para eliminar los radicales de hidroxilo en la peroxidación de lípidos³⁹. Se ha demostrado sistemáticamente que el resveratrol inhibe la degradación de proteínas y atenúa la atrofia de las fibras musculares esqueléticas al inhibir la activación y translocación del factor nuclear kappa beta al núcleo, a través de la inhibición de la quinasa I-kB¹⁰. También el resveratrol es capaz de inducir antioxidantes celulares y enzimas de fase 2, reduce la generación de H₂O₂ a través del aumento de los niveles de glutatión reducido y asimismo normaliza los niveles de la reductasa de glutatión oxidado y las actividades de mieloperoxidasa²¹. Las propiedades antiinflamatorias del resveratrol son debido a que causa la inhibición transcripcional de la ciclooxigenasa 2, así como otro jugador importante en la carcinogénesis, la ornitina descarboxilasa, mediante la inhibición de la proteína C quinasa¹. También se le atribuye actividad vasodilatadora, causada por la inhibición de la actividad de la NADH/NADPH oxidasa vascular, lo que conduce a una reducción en la producción de superóxido basal y, en consecuencia, disminución de la inactivación del óxido nítrico¹. Otro efecto es la reducción del estrés oxidativo, ya que disminuye la expresión de ARNm de la proteína de shock térmico de 70 KDa hepática, alivia la lesión hepática evidenciada por la disminución en suero de aspartato aminotransferasa y alanina aminotransferasa, disminuye la concentración del factor de necrosis tumoral hepática alfa y regula la expresión génica hepática relacionada con la inflamación⁶.



Metabolismo:

Hay pocos estudios reportados sobre el metabolismo de resveratrol en el organismo, pero Colom et al, en 2011, propone que después de la administración de resveratrol por vía oral entra rápidamente en el epitelio intestinal. Una vez en el enterocito, se metaboliza altamente a glucuro y sulfo conjugados que se excretan a la luz intestinal, mientras que el metabolismo en el hígado representa una extensa glucuronidación y sulfatación a través de las enzimas glucuronosiltransferasa y sulfotransferasa, respectivamente *trans*-resveratrol y sus conjugados se acumulan significativamente en este órgano y se excretan aún más en la bilis, lo que lleva a la recirculación enterohepática. Todos estos procesos influyen en la distribución a tejidos y posterior eliminación del organismo⁷. Por otro lado, otro estudio demostró que el *trans*-resveratrol-3-O-glucurónido es el metabolito primario del resveratrol en el hígado humano, y que el *trans*-resveratrol-3-O-glucurónido y el *trans*-resveratrol-3-sulfato son metabolitos significativos en la orina de ratas y en el suero de ratones, y están formados por hepatocitos, además de que no se detectaron metabolitos de la fase I del resveratrol, como oxidaciones, reducciones o hidrólisis⁴³.

Toxicidad de resveratrol en ratas

Se tiene reportado que a dosis de 1000 mg/kg de peso en ratas causa un aumento de peso en hembras y un número elevado eritrocitos en machos, mientras que en dosis de 3000 mg/kg de peso aumentaba los signos clínicos de toxicidad, causando pérdida de peso, valores elevados de balance de nitrógeno ureico, creatinina, fosfatasa alcalina, alanina aminotransferasa, bilirrubina total y albúmina, valores reducidos de hemoglobina, hematocrito, recuentos de glóbulos rojos y aumento de los recuentos de células blancas, daño renal grave⁹. Por otro lado, el consumo repetido de *trans*-resveratrol a 20 mg/kg/día no afecta negativamente a las variables probadas en ratas²².



2.2. Conceptos de estabilidad

2.2.1. Definición de estabilidad

La OMS define a la estabilidad como la capacidad de un producto farmacéutico para conservar sus propiedades químicas, físicas, microbiológicas y biofarmacéuticas dentro de límites especificados, a lo largo de su tiempo de conservación³³.

En la ICH Q1 la estabilidad se define como la capacidad de un fármaco o medicamento para permanecer dentro de las especificaciones establecidas para asegurar su identidad, potencia, calidad y pureza durante el periodo de reanálisis o de caducidad¹⁸.

En México, la definición es dada por la NOM-073-SSA1-2005, la cual cita que la estabilidad es la capacidad de un fármaco o un medicamento de permanecer dentro de las especificaciones de calidad establecidas, en el envase que lo contiene durante su periodo de vida útil³⁰.

La estabilidad es el lapso de tiempo desde la preparación inicial hasta el acondicionamiento del producto durante el cual la forma dosificada continúa cumpliendo con las especificaciones presentadas en la monografía, con respecto a la identidad, pureza, calidad y potencia⁴¹.

2.2.2. Factores que influyen en la estabilidad

La estabilidad de los productos farmacéuticos depende de factores ambientales, tales como la temperatura, la humedad y luz ambiental, por otra parte, de factores relacionados con el producto, por ejemplo, las propiedades químicas y físicas de la sustancia activa y de los excipientes farmacéuticos, la forma farmacéutica y su composición, el proceso de fabricación, la naturaleza del sistema de cierre del envase y las propiedades de los materiales de envase³³.



Tabla 1. Factores que influyen en la estabilidad de un producto farmacéutico³³.

Ambientales	Relacionados con el producto
Desarrollo microbiano	Propiedades fisicoquímicas del API y de los excipientes (presencia de impurezas, forma cristalina, tamaño de partículas, etc.)
Humedad	Forma farmacéutica y composición
Temperatura	Proceso de fabricación
Oxígeno	Naturaleza del contenedor o envase
Luz	
Vibración/Congelamiento	

2.2.3. Definición de estudios de estabilidad

Los estudios de estabilidad se definen como pruebas que se efectúan a un fármaco o a un medicamento por un tiempo determinado, bajo la influencia de temperatura, humedad o luz en el envase que lo contiene³⁰. Otra definición de estudios de estabilidad es que son serie de pruebas concebidas para obtener información sobre la estabilidad de un producto farmacéutico, a fin de definir su tiempo de conservación y su periodo de utilización en determinadas condiciones de envase y almacenamiento³³.

El objetivo de los estudios de estabilidad es proporcionar evidencia documentada de cómo la calidad de un fármaco o un medicamento varía con el tiempo, bajo la influencia de factores ambientales como: temperatura, humedad o luz, además de que permiten establecer las condiciones de almacenamiento, periodos de reanálisis y vida útil³⁰.



2.2.4. Tipos de estudios de estabilidad

Estudios de estabilidad acelerada: Son estudios diseñados bajo condiciones exageradas de almacenamiento para incrementar la velocidad de degradación química, biológica o los cambios físicos de un fármaco o de un medicamento³⁰. Es decir, son estudios ideados para aumentar la tasa de degradación química y de alteración física de un medicamento sometiéndolo a condiciones drásticas de almacenamiento, para posteriormente evaluar los efectos químicos a largo plazo en condiciones no aceleradas y para determinar los efectos de las desviaciones a corto plazo de las condiciones de almacenamiento señaladas en la etiqueta³³.

Estudios de estabilidad a largo plazo: Estudios diseñados bajo condiciones de almacenamiento controladas para evaluar las características físicas, químicas, biológicas, microbiológicas o biofarmacéuticas del fármaco o del medicamento durante el periodo de reanálisis o de caducidad, respectivamente³⁰. Estos experimentos son realizados durante y más allá del tiempo de conservación y el periodo de almacenamiento previstos, se hacen en muestras mantenidas en condiciones de almacenamiento semejantes a las que habrá en el mercado al que van destinadas. Estos resultados se utilizan para determinar el tiempo de conservación, confirmar el tiempo de conservación previsto y recomendar las condiciones de almacenamiento³³.



2.3. Generalidades de métodos analíticos indicativos de estabilidad

2.3.1. Definición de método analítico indicativo de estabilidad

La estabilidad química de las moléculas farmacéuticas es un motivo de gran preocupación, ya que afecta a la seguridad y eficacia del medicamento³. El método analítico indicativo de estabilidad es definido como un método analítico cuantitativo para un fármaco o un medicamento, capaz de distinguir cada ingrediente activo de otras sustancias y de sus productos de degradación³⁰. Según un documento de orientación de la FDA, un método analítico indicativo de estabilidad es un procedimiento analítico cuantitativo validado que se puede usar para detectar cómo la estabilidad de las sustancias y los productos farmacológicos cambia con el tiempo³.

2.3.2. Degradación forzada

La capacidad del método para monitorear un cambio en las propiedades químicas del medicamento a lo largo del tiempo invariablemente requiere un estudio de degradación forzada que se realizará en la sustancia y el producto farmacológico³⁷.

La degradación forzada es un proceso que implica la descomposición de productos y sustancias farmacéuticas en condiciones más severas que las condiciones aceleradas y, por lo tanto, genera productos de degradación que pueden estudiarse para determinar la estabilidad de la molécula.

2.3.3. Estudios de degradación forzada

Los estudios de degradación forzada ayudan a generar productos de degradación en un período de tiempo mucho más corto, en su mayoría unas pocas semanas. Las muestras generadas a partir de la degradación forzada pueden usarse para desarrollar el método de indicación de estabilidad que puede aplicarse más tarde para el análisis de muestras generadas a partir de estudios de estabilidad acelerado y a largo plazo³. Los estudios de degradación forzada deben evaluar la estabilidad de la sustancia farmacéutica en diferentes soluciones de pH, en presencia de oxígeno y luz, y a temperaturas elevadas y diferentes niveles de humedad³⁷. En la figura 6 se muestra un protocolo general de las condiciones de degradación utilizadas para sustancias y productos farmacológicos,



mientras que algunas condiciones utilizadas para estudios de degradación forzada se presentan en la Tabla 2.

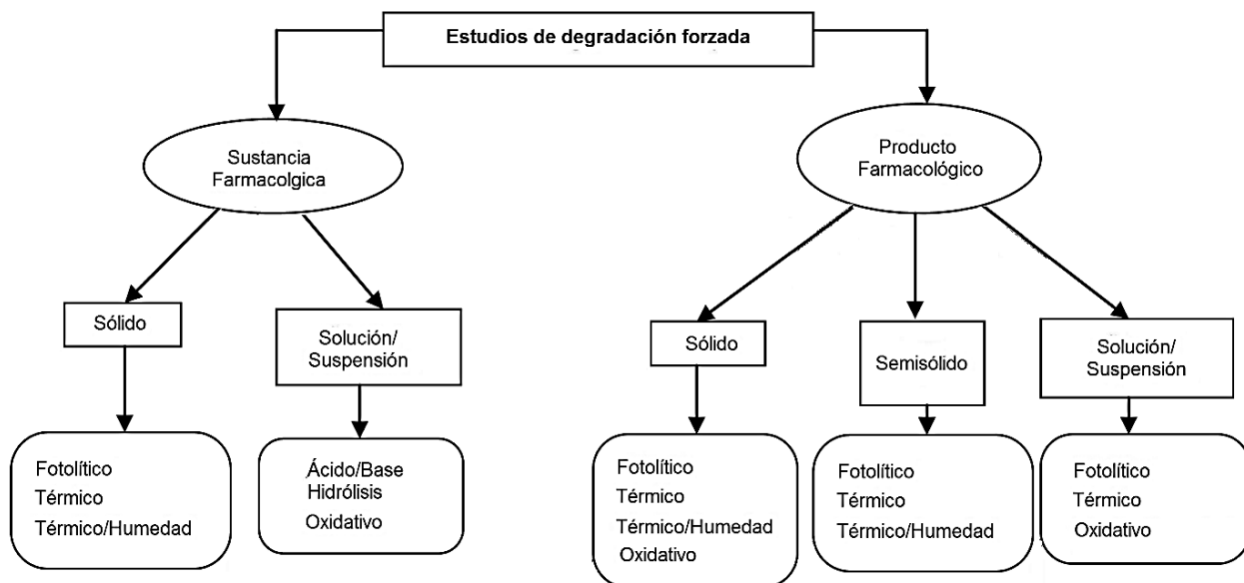


Figura 6. Esquemas de condiciones de estrés utilizadas para la degradación de la sustancia y el producto farmacológico³.

2.3.4. Aplicación de los estudios analíticos indicativos de estabilidad

Estos estudios además de establecer la especificidad también proporcionarán información de³⁷:

- Discernimiento de los productos de degradación en formulaciones que están relacionadas con sustancias farmacológicas en comparación con aquellas que están relacionadas con sustancias no farmacológicas (por ejemplo, excipientes).
- Elucidación de la estructura de los productos de degradación.
- Determinación de la estabilidad intrínseca de una molécula de sustancia farmacéutica en solución y estado sólido.
- Revelan el mecanismo de degradación termolítica, hidrolítica, oxidativa y fotolítica de la sustancia farmacológica y el producto farmacológico.
- Para generar formulaciones más estables.



Tabla 2. Condiciones utilizadas principalmente para estudios de degradación forzada³⁷

Tipo de degradación	Condición Experimental	Condición de almacenado	Tiempos de muestreo
Hidrólisis	Control API (sin ácido o base)	40°C, 60°C	1, 3 y 5 días
	HCl 0.1 M		
	HCl 0.1 M Control (sin API)		
	NaOH 0.1 N		
	NaOH 0.1 N Control (sin API)		
	pH: 2, 4, 6, 8		
Oxidativo	H ₂ O ₂ al 3%	25 °C, 60 °C	1, 3 y 5 días
	Peróxido control (sin API)	40 °C, 60 °C	
	Azobisisobutironitrilo (AIBN)		
	AIBN control (sin API)		
Fotolítico	Luz 1 x ICH	No Aplica	1, 3 y 5 días
	Luz 3 x ICH		
	Luz Control		
Térmico/Humedad	Cámara de calor	60° C	1, 3 y 5 días
		60° C /75% RH	
		80° C	
		80° C /75% RH	
	Control de calor	Temperatura ambiente	



2.4. Conceptos de cromatografía

2.4.1. Fundamento de cromatografía

La cromatografía se define como la técnica física de separación en la que los componentes de una muestra se distribuyen entre dos fases: una de ellas permanece fija (fase estacionaria), mientras que la otra se mueve (fase móvil) en contacto con ella en una dirección definida¹⁵. El término "cromatografía" abarca aquellos procesos destinados a la separación de las diversas especies de una mezcla en función de sus características de distribución entre una fase estacionaria y una móvil³⁸. En la Figura 7 se representa el proceso cromatográfico, en donde la fase móvil es la encargada de transportar los solutos a través de la fase estacionaria. Así, los componentes que sean retenidos con mayor fuerza por la fase estacionaria irán más lentos, por el contrario, los que sean retenidos con menor fuerza, avanzarán a mayor velocidad transportados por la fase móvil. La velocidad de migración de los analitos en la fase móvil a su paso a través de la fase estacionaria provoca la separación de los compuestos¹⁵.

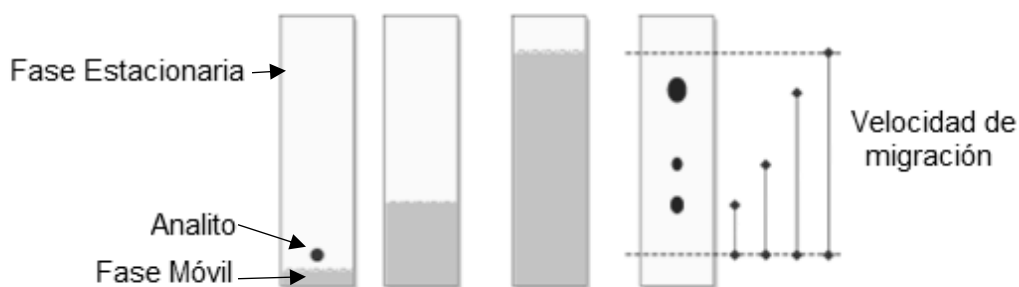


Figura 7. Representación de la técnica de cromatografía¹⁶.

2.4.2. Tipos de cromatografía

Los tipos de cromatografía se definen esencialmente de acuerdo con la naturaleza de las interacciones entre el soluto y la fase estacionaria, que pueden surgir del enlace de hidrógeno, las fuerzas de Vander Walls, las fuerzas electrostáticas, las fuerzas hidrófobas o basarse en el tamaño de las partículas³⁸.



Existen distintos criterios para clasificar los métodos cromatográficos (Tabla 3):

- Según el estado físico de las fases
- Según el mecanismo de separación
- Según la disposición o configuración de la fase estacionaria
- Considerando las polaridades relativas de las fases

Tabla 3. Tipos de cromatografía¹⁵.

Fase Estacionaria	Fase Móvil	Técnica Cromatográfica	Proceso Cromatográfico
Sólida	Líquida	C. de líquidos Capa Fina Columna	Absorción Intercambio iónico Exclusión Molecular Afinidad
	Gas	Capa Fina Columna	Absorción
Líquida	Líquida	C. de líquidos Capa Fina Columna	Reparto Afinidad
	Gas	C. de gases Columna	Reparto

Cromatografía según el estado físico de las fases:

- *Cromatografía Gas-Líquido*: utiliza como fase móvil un gas y en fase estacionaria un líquido¹⁵.
- *Cromatografía Gas-Sólido*: utiliza como fase móvil un gas y en fase estacionaria un sólido¹⁵.
- *Cromatografía Líquido-Líquido*: la fase móvil, al igual que la fase estacionaria, es un líquido¹⁵.
- *Cromatografía Líquido-Sólido*: la fase móvil es un líquido y la fase estacionaria un sólido¹⁵.



Cromatografía según el mecanismo de separación

- **Cromatografía de adsorción:** los componentes de la muestra son retenidos mediante adsorción selectiva en la superficie de un sólido de elevada superficie específica que constituye la fase estacionaria. Las moléculas de soluto y disolvente (fase móvil) compiten por las posiciones en el adsorbente. Este mecanismo es el más habitual en cromatografía líquido-sólido¹⁵.

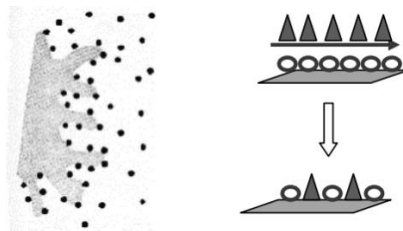


Figura 8. Proceso de cromatografía de adsorción¹⁵.

- **Cromatografía de reparto:** la fase estacionaria es un líquido que se encuentra impregnando un soporte sólido. El soluto se reparte entre la fase estacionaria líquida y la fase móvil de acuerdo con su solubilidad en cada una de ellas¹⁵.

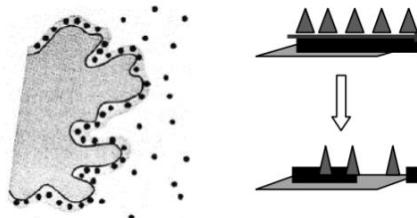


Figura 9. Proceso de cromatografía de reparto¹⁵.

- **Cromatografía de intercambio iónico:** La fase estacionaria es un sólido que contiene grupos cargados positiva o negativamente, teniendo la capacidad de separar especies iónicas. Los solutos de carga opuesta a la fase estacionaria son atraídos por ésta mediante fuerzas electrostáticas¹⁵. La matriz tiene una carga iónica opuesta a la de la molécula que se va a separar, y la afinidad de la molécula a la columna se logra con enlaces iónicos. Las matrices de intercambio iónico cargadas positivamente se denominan matrices de intercambio aniónico y adsorben proteínas cargadas negativamente. Mientras que las matrices unidas con grupos cargados negativamente se conocen como matrices de intercambio catiónico, y adsorben proteínas cargadas positivamente⁸.

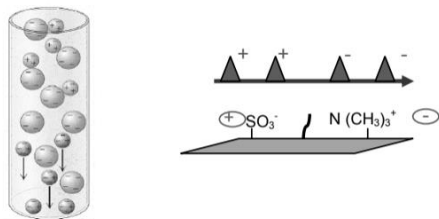


Figura 10. Proceso de cromatografía de intercambio iónico¹⁵.

- *Cromatografía de exclusión molecular*: en este tipo de separación cromatográfica la fase estacionaria está constituida por un polímero entrecruzado de tamaño de poro definido. Las moléculas grandes, no compatibles con el tamaño de poro, siguen su avance, mientras que las más pequeñas quedan retenidas en los intersticios del gel. Es útil para especies neutras de alto peso molecular realizándose la separación en función de su tamaño¹⁵.

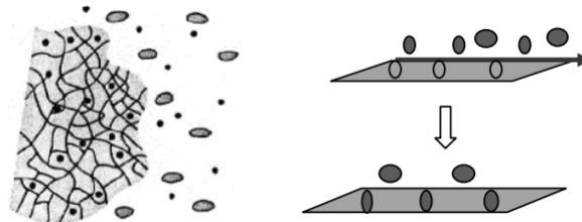


Figura 11. Proceso de cromatografía de exclusión molecular¹⁵.

- *Cromatografía de afinidad*: permite la separación de mezclas por su interacción específica con un determinado ligando de actividad: enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo¹⁵. Esta técnica de cromatografía se utiliza para la purificación de enzimas, hormonas, anticuerpos, ácidos nucleicos y proteínas específicas⁸.

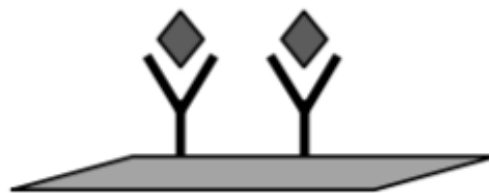


Figura 12. Proceso de cromatografía de afinidad¹⁵.



Según la disposición o configuración de la fase estacionaria

- **Cromatografía en columna:** la fase estacionaria se encuentra empaquetada en el interior de una columna generalmente fabricada en acero, polímero o vidrio¹⁵. Esta técnica se utiliza para la purificación de biomoléculas. En una columna, primero se aplica la muestra a separar, luego se aplica el tampón de lavado. Se garantiza su flujo a través del material de la columna interior colocado sobre un soporte de fibra de vidrio. Las muestras se acumulan en la parte inferior del dispositivo de forma dependiente del tiempo y del volumen⁸.

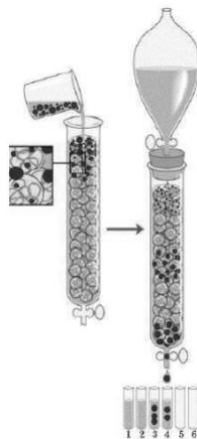


Figura 13. Proceso de cromatografía en columna¹⁵.

- **Cromatografía plana:**
 - Cromatografía en capa fina: la fase estacionaria está extendida sobre un soporte sólido inerte. La muestra para análisis se aplica por medio de un tubo capilar sobre la superficie de una capa fina adsorbente en forma de banda o punto¹⁵.
 - Cromatografía en papel: se denomina de esta forma a la cromatografía plana que emplea celulosa como fase estacionaria¹⁵. En este método, un papel de filtro grueso comprendía el soporte, y las gotas de agua asentadas en sus poros formaban la "fase líquida" estacionaria. La fase móvil consiste en un fluido apropiado colocado en un tanque de revelado⁸.

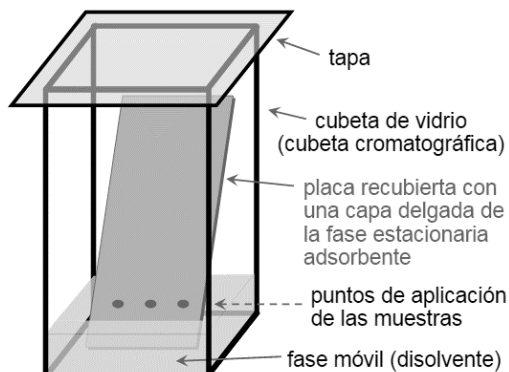


Figura 14. Cromatografía plana¹⁶.

Considerando las polaridades relativas de las dos fases

- *Cromatografía en fase normal:* En esta modalidad la fase estacionaria es más polar que la fase móvil. Normalmente la columna esta rellena con una sílice enlazada a un resto orgánico que posee un grupo polar (cianos, dioles, aminos). La polaridad de este grupo controla la selectividad de la fase estacionaria. La elución se lleva a cabo con disolventes o mezcla de disolventes de polaridad inferior a la fase estacionaria (dietiléter, cloroformo o n-hexano)¹⁵. La interacción que surge entre el analito y la fase estacionaria se caracteriza por un enlace débil: dipolo inducido por dipolo, dipolo-dipolo, enlaces de hidrógeno o unión π -compleja. La fuerza de las interacciones depende no solo de los grupos funcionales en la molécula de muestra sino también de factores estéricos³⁸.
- *Cromatografía en fase inversa:* En este caso la fase estacionaria es menos polar que la fase móvil y es la habitualmente utilizada en la mayoría de las aplicaciones. Como relleno para la fase estacionaria se emplean cadenas hidrocarbonadas de distinta longitud, tal como C8 o C18, químicamente unidas a una base de sílice. La fase móvil suele estar constituida por un disolvente o mezcla de disolventes de elevada polaridad. El papel de la fase móvil en este tipo de cromatografía es de gran importancia, ya que con sólo uno o dos tipos de fases estacionarias y modificando la naturaleza y composición de la fase móvil, pueden obtenerse separaciones que van desde hidrocarburos alifáticos hasta separaciones de enantiómeros¹⁵.



2.5. Generalidades de la cromatografía líquida de alta resolución

2.5.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución

La cromatografía líquida (HPLC), es una técnica utilizada para separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria (columna) y una fase móvil. La fase estacionaria es sílice que se ha tratado con RMe_2SiCl , donde R es una cadena alquílica como $\text{C}_n\text{H}_{2n+1}$. La fase móvil actúa de portador de la muestra. La muestra en solución es inyectada en la fase móvil. Los componentes de la solución emigran de acuerdo con las interacciones no covalentes de los compuestos con la columna. La muestra es forzada a pasar a través de una columna por la fase móvil a elevada presión, lo que disminuye el tiempo que los componentes separados permanecen en la fase estacionaria, por lo tanto, el tiempo de difusión dentro la columna. Estas interacciones químicas, determinan la separación de los contenidos en la muestra, que serán identificados por el detector, el cual dependerá de la naturaleza de los compuestos a determinar²⁸.

Cabe aclarar que HPLC, UPLC (Cromatografía de líquidos de ultra resolución) y el UHPLC (cromatografía líquida de resolución ultra alto), tienen el mismo fundamento, pero se diferencian en el tamaño de partícula y la presión ejercida en el sistema cromatográfico. La mayoría de los métodos de HPLC se desarrollan en partículas de 2.5 a 5 micrones de tamaño, mientras que en UPLC y UHPLC las partículas son menores o igual a 2 micras; Las partículas menores de 2 micrones requieren una presión más alta para funcionar, por lo que los sistemas UHPLC o UPLC deben ser capaces de funcionar por encima de 6.000 PSI, que suele ser el límite superior de las HPLC convencionales. Dado que las partículas sub-2 micras son tan pequeñas, la trayectoria de difusión entre los analitos de la muestra y la fase estacionaria es más corta y la eficiencia es mayor. El UHPLC opera en el rango de 20,000 psi. Ofrecen tasas de eficiencia más altas que los sistemas UPLC, aunque también son propensos al bloqueo⁴².



2.5.2. Equipo de HPLC

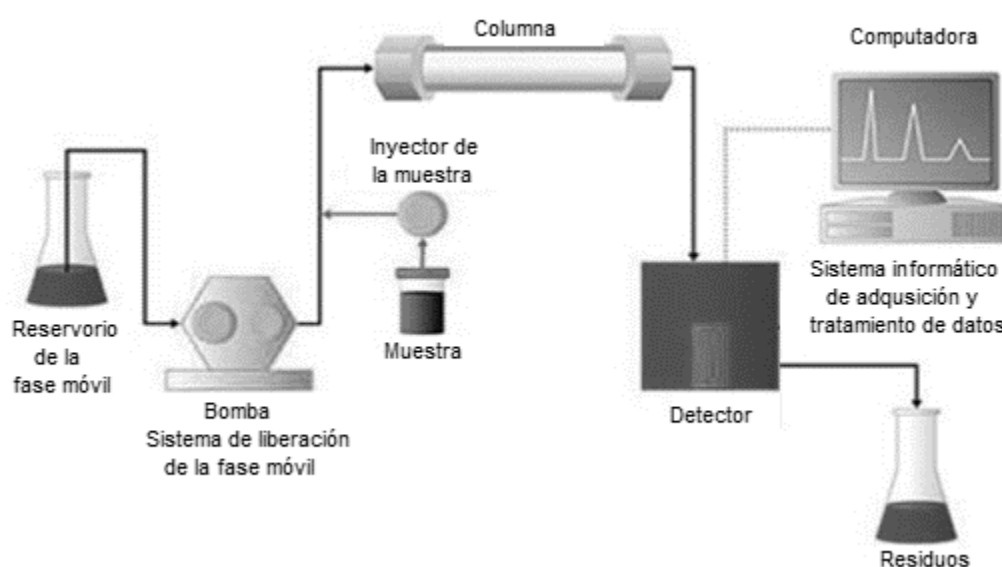


Figura 15. Componentes del equipo de HPLC¹⁵.

Un cromatógrafo consiste en un sistema compuesto de un reservorio de fase móvil, una bomba de alta presión, un sistema de introducción de muestra, la columna cromatográfica y, a continuación, el acoplamiento de un sistema de detección y de un sistema de adquisición y tratamiento de datos que permita visualizar la separación¹⁵ (Figura 15).

Reservorio de fase móvil

Los depósitos que van a contener la fase móvil que se va a utilizar en el sistema cromatográfico deben estar fabricados en un material inerte a la posible reacción con la fase móvil. Habitualmente, consisten en un reservorio de borosilicato equipado con un tapón perforado y un tubo flexible para la adecuada conexión al sistema de bombeo. Por el otro extremo, el tubo de conexión sumergido en el recipiente de fase móvil acaba en un filtro de 2 μm de tamaño de poro con el fin de prevenir la entrada en la bomba de partículas en suspensión¹⁵.



Sistema de liberación de la fase móvil

El sistema de bombeo es un componente crítico del sistema cromatográfico cuya misión es hacer pasar un caudal constante de fase móvil a través de la columna cromatográfica. Por tanto, la calidad de una bomba en HPLC se mide atendiendo a la reproducibilidad y constancia del caudal suministrado¹⁵. En general, los sistemas de bombeo deben cumplir los siguientes requisitos:

- Estar fabricados de materiales químicamente inertes a la fase móvil.
- Generar presiones por encima de 6000pSi (≈ 400 atm).
- Suministrar un caudal libre de pulsaciones o llevar un sistema amortiguador de las mismas. (las pulsaciones no afectan a la separación en sí, pero contribuyen al ruido del detector y, por tanto, disminuyen la sensibilidad)
- Proporcionar caudales adecuados para diferentes tipos de columnas. Normalmente se exigen caudales de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ a 10 mL/min.
- Suministrar caudales reproducibles a lo largo del tiempo ya que de ello depende la reproducibilidad de los tiempos de retención.
- Los cabezales de la bomba deben tener pequeño volumen para facilitar y llevar a cabo cambios rápidos en la composición de la fase móvil.

Sistema de desgasificación de disolventes

Los componentes de la fase móvil deben desgasificarse y filtrarse antes de su uso. Se emplean varios métodos para eliminar los gases disueltos en la fase móvil. Incluyen calentamiento y agitación, desgasificación al vacío con un aspirador, filtración a través de filtros de 0,45, desgasificación al vacío con una membrana soluble en aire, purificación por helio, ultrasonidos o purga o combinación de estos métodos. Los sistemas de HPLC también cuentan con un sistema de desgasificación en línea, que elimina continuamente los gases disueltos de la fase móvil³⁸.

Sistema de elución de gradiente

Las columnas de HPLC pueden ejecutarse isocráticamente, es decir, con eluyente constante o pueden ejecutarse en el modo de elución en gradiente en el que la composición de la fase móvil varía durante la ejecución. La elución gradual es un medio para superar el problema de tratar con



una mezcla compleja de solutos. Este sistema tiene relación directa con el sistema de bombeo de la fase móvil³⁸.

Sistemas de inyección de muestra

Los sistemas de introducción de muestra se sitúan entre el sistema de bombeo y la columna cromatográfica. Son montajes diseñados para introducir un volumen de muestra líquida en el sistema hidrodinámico de alta presión. Es un elemento fundamental en el cromatógrafo de líquidos y de su buen funcionamiento depende la correcta cuantificación de los picos y su resolución¹⁵. Dos medios para la introducción del analito en la columna son la inyección en una corriente que fluye y una inyección de detención del flujo. Esta técnica se puede utilizar con una jeringa o una válvula de inyección. El inyector automático es una versión controlada por microprocesador del inyector universal manual³⁸. El sistema de inyección debe cumplir los siguientes requisitos¹⁵:

- Introducir la muestra dentro del sistema, en una banda cromatográfica lo más estrecha posible, originando la mínima dispersión de la muestra.
- Poder introducir volúmenes pequeños (del orden de microlitros) y poder variar dicho volumen fácilmente.
- Debe ser inerte al ataque químico
- Ser capaces de trabajar a presiones elevadas.
- Proporcionar resultados reproducibles, tanto en la cantidad de muestra inyectada como en el ensanchamiento que originan en la banda cromatográfica.
- Su funcionamiento no debe alterar las características hidrodinámicas del sistema: no interrumpir el flujo y no variar momentáneamente ni la presión ni el caudal.

Columnas

La columna cromatográfica es la parte esencial del cromatógrafo de líquidos ya que en ella tiene lugar la separación o discriminación entre analitos e interferentes. Por tanto, debe dedicarse una atención especial al material que se elige como relleno de la columna y también a la influencia de los parámetros de la columna sobre su eficacia¹⁵. La sílice (SiO_2 , H_2O) es la sustancia más utilizada para la fabricación de materiales de embalaje, que consiste en una red de enlaces de siloxano en



una estructura tridimensional rígida que contiene poros interconectados, por lo tanto, existe una amplia gama de productos comerciales con superficies que van desde 100 a 800 m²/g y tamaños de partícula de 3 a 50 μm³⁸.

Tipos de columnas

Un parámetro generalmente elegido para clasificar las columnas es su diámetro interno (dc). Atendiendo a este criterio se pueden encontrar¹⁵:

- Columnas preparativas (dc > 10 mm).
- Columnas semipreparativas (5 mm < dc < 10 mm).
- Columnas analíticas (2 mm < dc < 5 mm).
- Microcolumnas, que engloban:
 - Columnas de pequeño diámetro, conocidas como “microbore” con diámetros internos comprendidos entre 0.5 mm < dc < 2 mm y estructura similar a las columnas analíticas.
 - Columnas capilares rellenas, en las que el relleno se encuentra en el interior de un tubo de sílice fundida de dc < 0.5 mm, generalmente entre 40 y 400 μm.
 - Columnas capilares abiertas, cuya estructura es similar a la de las columnas capilares de cromatografía de gases, con una capa de fase estacionaria depositada homogéneamente sobre la pared interior de un capilar de sílice fundida de diámetro interno entre 3-10 μm y de gran longitud.

Mantenimiento de columnas

La columna es la parte esencial del cromatógrafo de líquidos ya que en ella es donde se realiza la separación de los compuestos. Con el fin de prolongar su vida útil y evitar un rápido deterioro es recomendable seguir una serie de consejos:

- Los disolventes de la fase móvil deben filtrarse y desgasificarse antes de su uso.
- En la mayoría de las columnas convencionales es conveniente utilizar una precolumna cuando se trabaja a pH > 8.
- Es conveniente utilizar un filtro en línea para eliminar partículas.
- Trabajar a un valor de pH donde la fase móvil no precipite.



- No dejar fases móviles que contengan tampones o reactivos de pares iónicos en la columna cromatográfica durante más de un día sin utilizarse.
- Si se utiliza una columna a pH o temperaturas altas debe resilanizarse para recuperar sus características iniciales.
- Las columnas cromatográficas deben mantenerse en el disolvente recomendado por el fabricante cuando no se utilizan y se almacenan durante largos períodos de tiempo.

Detectores

Una vez concluida la separación, surge el problema de detectar las zonas de soluto y, en caso necesario, medir su concentración. Para ello se utilizan dispositivos (detectores) capaces de transformar en señal eléctrica alguna propiedad de la fase móvil o de los solutos, siendo capaces de proporcionar información sobre la presencia de las especies separadas en la columna cromatográfica¹⁵. Las características ideales para un buen detector de HPLC pueden resumirse en las siguientes¹⁵:

- Alta sensibilidad.
- Respuesta universal a todos los solutos.
- Amplio intervalo lineal de concentración.
- Debe ser no-destructivo.
- Insensible a cambios ambientales: presión, caudal, temperatura y a cambios en la composición de la fase móvil (modalidad de gradiente).
- Debe operar continuamente durante largo tiempo y su empleo debe ser fácil y cómodo para el analista.
- Su funcionamiento debe ser posible de automatizar para incorporarlo a los instrumentos de HPLC comandados por un único microprocesador.



Detectores más utilizados para análisis en HPLC

- Detectores espectrofotométricos: Están basados en la absorción de la radiación UV-visible por las moléculas de soluto. En estos detectores la luz emitida por la lámpara pasa a través de un monocromador o un filtro donde se selecciona una longitud de onda y llega a la célula de detección por la que está pasando la muestra eluida de la columna. La intensidad de luz transmitida se mide con un fotomultiplicador. La relación entre la luz incidente en la célula y la luz transmitida es proporcional a la concentración de soluto de acuerdo con la ley de Lambert & Beer. Estos detectores miden una propiedad del soluto y no del eluyente¹⁵.
 - *Detectores de longitud de onda fija:* Los detectores más sencillos de UV-visible funcionan con radiación de una única longitud de onda generada por una lámpara específica. Gran parte de estos detectores operan a 254 nm empleando una lámpara de vapor de mercurio que proporciona una elevada emisión de radiación no monocromática por lo que es necesario el empleo de filtros¹⁵.
 - *Detectores de longitud de onda variable:* son más versátiles y permiten un grado de automatización elevado en los análisis de rutina (Figura 16). Estos detectores utilizan una lámpara de deuterio (longitudes de onda, λ , entre 190-400 nm) y una de wolframio (λ entre 400-700 nm) acopladas a un sistema de filtros o a un monocromador para obtener fuentes monocromáticas. De este modo se puede seleccionar la longitud de onda a la que los compuestos de interés presentan la máxima absorbancia¹⁵.

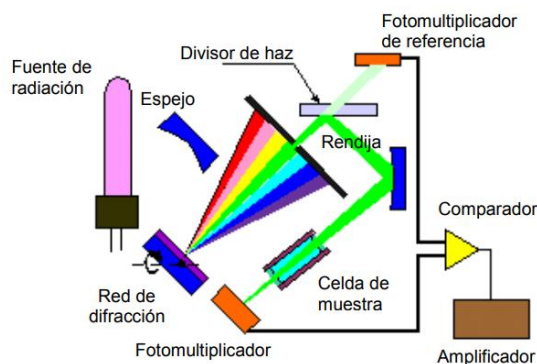


Figura 16. Detector espectrofotométrico UV/Visible de longitud de onda variable¹⁵.



- *Detectores de matriz de fotodiodos (diodo-array):* brindan una información más completa, ya que registran simultáneamente la señal a diferentes longitudes de onda suministrando el espectro de la disolución que atraviesa la celda de detección. Proporcionan información en tres dimensiones: tiempo, absorbancia y longitud de onda. Por tanto, estos detectores además de poner de manifiesto la elución de los solutos permiten obtener información cualitativa sobre su estructura a través de sus espectros ultravioleta y confirmar la pureza de los picos determinando si se trata de un único componente o si bajo el mismo pico eluye más de una sustancia¹⁵.

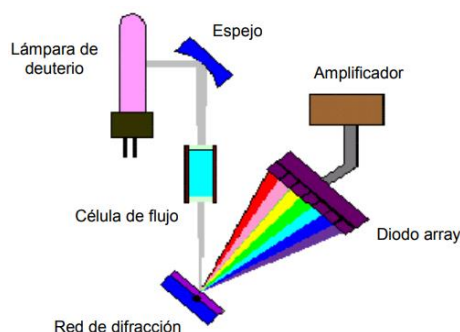


Figura 17. Detector espectrofotométrico UV/Visible de fotodiodos¹⁵.

- *Detectores de fluorescencia:* Utilizan la propiedad que tienen algunas sustancias de emitir radiación cuando se les excita con luz ultravioleta o visible. Son más sensibles que los espectrofotométricos pero su intervalo dinámico lineal es menor y son mucho menos universales, ya que el número de moléculas que presentan fluorescencia es limitado, aunque cabe la posibilidad de derivatizar las sustancias a analizar¹⁵.
 - *Fotómetros de fluorescencia:* son los detectores de fluorescencia más sencillos provistos de una celda de flujo de pequeño volumen (5-8 μ l), una fuente de luz y un sistema de filtros, uno para la excitación y otro para la emisión¹⁵.
 - *Detector de fluorescencia con monocromador:* permite elegir las longitudes de onda de excitación y de emisión¹⁵.



Figura 18. Detector de fluorescencia¹⁵.

En ambos casos la luz fluorescente se recoge en una dirección que forma un ángulo recto con la de excitación minimizando el ruido de fondo procedente de la luz incidente. Las principales ventajas de estos detectores son su sensibilidad y selectividad. Su alta selectividad se debe a que muy pocas moléculas presentan fluorescencia. En cuanto a la sensibilidad estos detectores son entre 10-100 veces más sensibles que los de UV-visible debido a que las emisiones fondo son virtualmente cero¹⁵.

- *Detectores refractométricos:* El fundamento de este detector es la medida en continuo y de forma diferencial, en relación con un líquido usado como referencia, del índice de refracción del eluyente de la columna. Utilizando como líquido de referencia la propia fase móvil puede determinarse la presencia de un soluto por los cambios provocados en el índice de refracción. La mayor ventaja de estos detectores es su universalidad. Sus principales inconvenientes son su falta de sensibilidad y que no permiten trabajar en gradiente (no soportan cambios en la composición de la fase móvil). Aunque en principio su sensibilidad podría ser alta está limitada porque estos detectores son muy susceptibles a pequeñas variaciones de la presión y la temperatura¹⁵.
- *Detectores electroquímicos:* Los detectores electroquímicos se basan en la medida de propiedades eléctricas de la materia mediante el uso de electrodos de diferente naturaleza. Son detectores muy sensibles, selectivos y versátiles puesto que existen muchas sustancias electroactivas tanto orgánicas como inorgánicas y numerosas técnicas electroanalíticas bien establecidas¹⁵.



- Detectores electroquímicos amperométricos: se basan en la medida de la intensidad de corriente eléctrica que se genera debida al paso del analito por la celda de detección donde se le aplica una diferencia de potencial que provoca la reacción de oxidación o reducción de este mismo. La intensidad de corriente eléctrica registrada es proporcional a la concentración de las especies electrolizadas¹⁵.
- Detectores coulombimétricos: se basan en el mismo principio que los amperométricos, pero en este caso se provoca la oxidación o reducción completa del soluto, mediante el aumento de la superficie de contacto entre el eluyente y el electrodo. Los detectores coulombimétricos son insensibles a los cambios de caudal y temperatura y presentan una respuesta absoluta por lo que no requieren calibración previa una vez conocido el número de electrones involucrados en el proceso electródico¹⁵.
- *Espectrofotometría de infrarrojos por transformada de Fourier (FTIR)*: Estos espectrofotómetros están basados en el interferómetro de Michelson realizando el tratamiento de los datos mediante la transformada de Fourier, es decir, observa todas las frecuencias simultáneamente e integra la señal sobre todas estas frecuencias. Las ventajas de acoplar estos equipos a los HPLC son la gran velocidad para obtener espectros de infrarrojo y la sensibilidad¹⁵.
- *Espectrometría de masas*: El acoplamiento de un espectrómetro de masas como detector de HPLC suele considerarse como una técnica híbrida particular (LC-MS) capaz de proporcionar información estructural de los solutos. Se basa en la obtención de iones moléculas orgánicas en fase gaseosa, una vez obtenidos estos iones se separan de acuerdo a su masa/carga para ser detectados. Esta técnica ofrece una gran sensibilidad y un gran número de posibilidades pudiendo identificar y cuantificar sustancias a partir de unos 100 pg y 100 ng de muestra respectivamente¹⁵.



2.5.3. Parámetros cromatográficos

- Cromatograma: Se denomina así al gráfico de respuesta del detector en función del tiempo, es decir, es un registro de las señales de respuesta producidas en el detector ante la presencia de los analitos a la salida de la columna cromatográfica¹⁵.
- Pico cromatográfico: señales registradas que representa el número de compuestos separados y suministra información acerca del grado de complejidad de la muestra¹⁵.
- Tiempo de retención (t_r): es el tiempo que transcurre desde la inyección de la mezcla hasta que un determinado soluto alcanza el detector¹⁵.
- Volumen de retención (V_R): es el volumen de fase móvil que debe fluir por la columna para llevar a cabo la elución de un componente dado¹⁵.
- Tiempo muerto (t_M): tiempo que transcurre entre la inyección y la salida de una sustancia que no interacciona con la fase estacionaria, es decir, aquella sustancia cuya velocidad a lo largo de la columna cromatográfica coincide con la velocidad de la fase móvil¹⁵.
- Volumen muerto (V_M): será el volumen de fase móvil que queda retenido en la columna cromatográfica¹⁵.

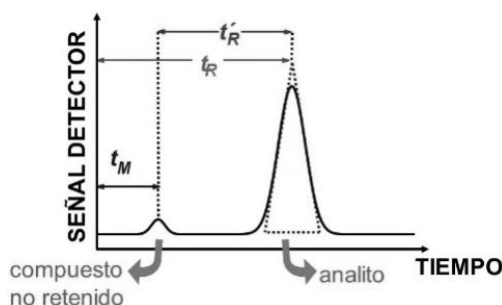


Figura 19. Ejemplo de un cromatograma¹⁴.

- Factor de capacidad (k'): describe la distribución del soluto y que hace referencia a la cantidad total de éste en cada fase involucrada en el sistema cromatográfico¹⁵.

$$k' = \frac{t_r - t_M}{t_M}$$

- Si $k' < 1$, la elución es demasiado rápida para la determinación de t_r .
- Si $k' > 10$, la elución es demasiado lenta.



- Los valores más adecuados para la separación están comprendidos entre 1 y 5.
- Ancho a la base (w_b): es la porción de la línea base interceptada por las tangentes al pico. Generalmente el valor es de 4σ para un pico gaussiano¹⁵.
- Ancho a la mitad de la altura ($w_{1/2}$): una medida más reproducible, adecuada para evaluar manualmente la eficiencia del sistema¹⁵.

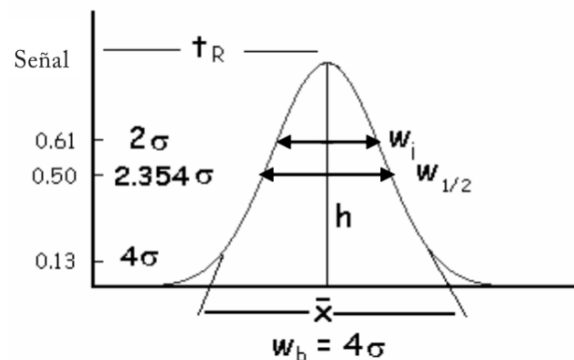


Figura 20. Representación de la función de Gauss¹⁴.

- Número de platos teóricos (N): este parámetro indica el número de veces que en una columna cromatográfica existe una altura equivalente a un plato teórico, el cual representa un equilibrio teórico de distribución del soluto entre las fases¹⁵.

$$N = 16 \left(\frac{tr}{w_b} \right)^2 = 5.54 \left(\frac{tr}{w_{1/2}} \right)^2 = 2\sigma \left(\frac{tr}{\text{área/altura}} \right)^2$$

- Altura del plato teórico (H): segmento de columna que representa un plato teórico. Es la medida inversa de la eficiencia del sistema, entre menor sea H el sistema es más eficiente¹⁵.

$$H = \frac{\text{Longitud de la columna (mm)}}{N}$$

- Factor de coleo: es una medida del grado de asimetría de un pico¹⁵. Es calculado por:

$$T = \frac{w_{0.05}}{2F}$$

Donde $w_{0.05}$ representa el ancho del pico al 5% de la altura y f es la distancia del máximo del pico hasta el borde inicial del pico, midiendo la distancia en un punto ubicado al 5% de la altura desde de la línea base.

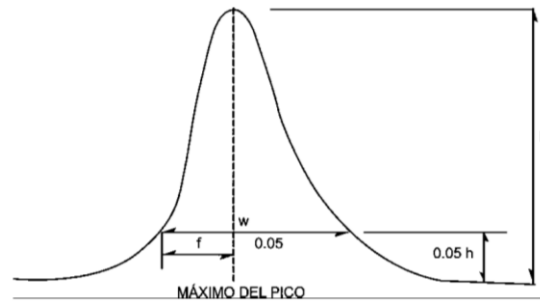


Figura 21. Pico cromatográfico asimétrico¹².

- Factor de selectividad (α): permite relacionar las constantes de distribución de dos solutos de una mezcla¹⁵.

$$\alpha_{2,1} = \frac{tr_2 - t_M}{tr_1 - t_M}$$

- Se considera que la selectividad es aceptable a partir de valores de $\alpha \geq 1.14$

- Resolución cromatográfica (R_s): es una medida cuantitativa de la capacidad de una columna para separar dos analitos, la cual se mide entre dos picos contiguos¹⁵.

$$R_s = \frac{tr_2 - tr_1}{\left(\frac{w_{b1} + w_{b2}}{2}\right)}$$

La resolución mínima aceptable en mezclas sencillas es 1.0, una resolución de 1.5 representa separación a la línea base¹⁵.

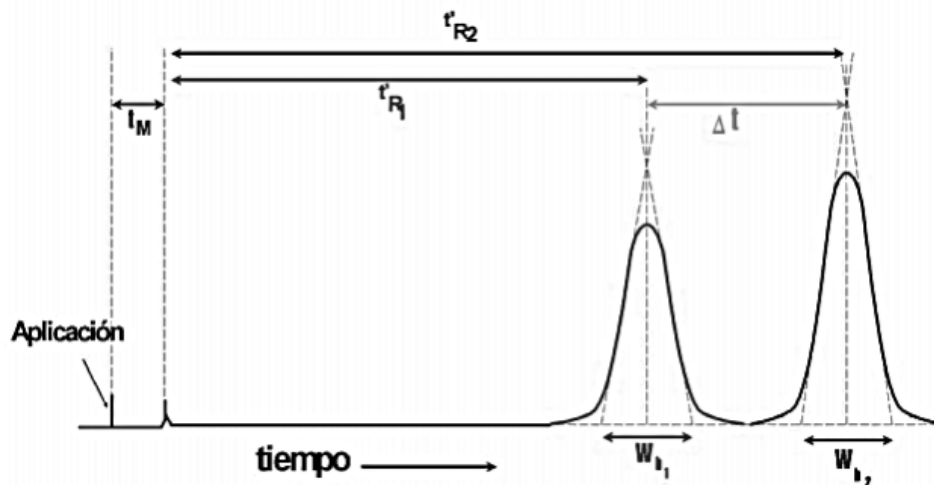


Figura 22. Representación de cromatograma de dos picos²⁷.



2.6. Análisis Cuantitativo

A la hora de abordar un análisis cromatográfico cuantitativo se deben tener en cuenta las características analíticas¹⁵:

- Para asegurar que la determinación a realizar sea válida el componente que va a ser cuantificado debe estar perfectamente separado e identificado.
- La preparación de la muestra debe ser reproducible y deben existir patrones de pureza conocida disponibles.
- La señal cromatográfica correspondiente al analito a cuantificar puede llevarse a cabo mediante la medida de la altura del pico o del área de pico.
- La medida de la altura de pico es adecuada para picos cromatográficos simétricos, siendo sensible a cambios en la temperatura de la columna y al envejecimiento de la misma.
- Lo más exacto y preciso es la medida del área de pico mediante técnicas electrónicas.

2.6.1. Cuantificación por normalización interna

Se basa en la medida del área de pico de cada señal que aparece en el cromatograma. El área total constituye el 100% y cada señal cromatográfica se expresa como un porcentaje del total. Se asume que la respuesta del detector a una concentración determinada es la misma independientemente del soluto que origine dicha señal, en caso contrario, es necesario calcular los factores de respuesta¹⁵.

2.6.2. Cuantificación por estandarización externa

Consiste en la construcción de una curva de calibrado usando patrones de la sustancia a cuantificar de concentración o masa conocida¹⁵.

2.6.3. Cuantificación por patrón interno

Consiste en la adición de una cantidad constante y medida exactamente de un compuesto puro (patrón interno) a un volumen de la muestra que se desea cuantificar. Se cuantifica tanto los patrones como la muestra y se construye la curva de calibración a partir de la relación área patrón/área patrón interno. Para que una sustancia pueda ser utilizada como patrón interno debe ser estable, de elevada pureza, estructuralmente similar a los compuestos de interés¹⁵.



2.7. Metodologías reportadas

Tabla 4. Recopilación de datos reportados de identificación de trans-resveratrol por HPLC.

Autor	Muestra	Detector	Columna	Fase móvil	T°	Flujo	Vi	tr	LC	LD
Kurangi, B., et al (2019)	Plasma humano	DAD	Luna C18, 250×4.6 mm, 5 µm, Phenomenex	Acetonitrilo: Buffer de fosfatos pH=6.01% (55:45)	35°C	1 mL/min	10 µL	3.3 min	-	-
Zupančič, S., et al (2015)	t-RSV al 99.6%	UV	C18 (3.145µm, 250×4.6 mm, YMC Europe)	Agua: metanol (50:50) con ácido acético al 0,25%.	30°C	1 mL/min	20 µL	6.2 min	0.26 µg/mL	0.25 µg/mL
Kumar, S., et al (2016)	Plasma humano	UV/VIS	Synexi 4 µ Hydro-RP 80 A de Phenexex (C18)	Metanol: acetonitrilo: ácido fosfórico al 0,1% (60:10:30)	-	0,8 mL/min	20 µL	4.3 min	2.85 ng/mL	0.95 ng/mL
Omar, J. M., et al (2014)	Suplemento alimenticio	UV	Luna C18, 250 ×4,6 mm, 5 µm, Phenomenex	FM A: 0,1% de ácido fórmico, FM B: MetOH con 0,1% de ácido fórmico. Inicio: 50% de A y 50% de B, cambiado linealmente a 100% de B por 10 min. Se mantuvo por 5 min a 100% B. El sistema se volvió a equilibrar durante 7 min con el disolvente inicial	35°C	-	20 µL	5.9 min	0.1 µg/mL	0.03 µg/mL
Rocha, G., et al (2014)	Plasma de ratas	DAD	C18 Xterra Waters, 5µm, 4.6 mm x 250 mm	Metanol: agua (51: 49) (v/v)	25°C	0,9 mL/min	20 µL	6.4 min	229 ng/mL	68 ng/mL
Iranshahy, M., et al (2013)	Plasma humano	UV	C18 hypersil 4.6 ×250 mm.	Metanol: agua: ácido acético (60: 38: 2)	-	1 mL/min	40 µL	7 min	0.02 µg/mL	0.006 µg/mL
Biasutto, L., et al (2010)	Plasma de ratas	UV	Gemini C18, 3 µm, 150 × 4,6 mm, Phenomenex	FM A: agua con 0,1% de ácido Trifluoroacético, FM B: H2O con 0,1% de acetonitrilo El gradiente para B: 30% durante 5 min. de 30% a 60% en 15 min. de 60% a 100% en 5 min.	-	0,7 mL/min	-	9 min	0.12 µM	0.04 µM
Huang, H., et al (2008)	Plasma de ratas	DAD	Aglient Zorbax SB-C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm)	FM (A): acetonitrilo, FM (B): ácido acético 0.5% (v/v), Gradiente para A de: 0-10 min: 18-25%, 10-25 min: 25-40%	30°C	1 mL/min	10 µL	16.4 min	23.4 ng/mL	0.059 ng/mL
Liazid, A., et al (2007)	Piel y semilla de uvas	RF	Chromolith TH Performance RP18e, 4.6 mm, 100 mm; Merck	FM A: metanol al 10% con ácido acético al 2% en agua. FM B: metanol al 90% y ácido acético al 2% en agua. Tiempo de A: 0 min, 100%; 1 min, 94%; 4 min, 87%; 9 min, 50%; 14 min, 0%.	-	5 mL/min	10 µL	9 min	-	-
Katsagonis, A., et al (2005)	Plasma de ratas	UV	C18 Novapack 150 4.0 mm (4 mm particle size)	Acetonitrilo: Buffer de fosfatos pH 4.8, 30 mM (25:75)	25°C	1 mL/min	20 µL	4.6 min	0.33 mg/mL	0.10 mg/mL
Careri, M., et al (2003)	Vino rojo y uvas	DAD	Luna C18, 250 ×2 mm, 5 µm, Phenomenex	Ácido fórmico al 1%: acetonitrilo: 2-propanol (70: 22: 8)	30°C	0,2 mL/min	5 µL	12 min	0.30 mg/mL	0.07 mg/mL



2.8. Validación de Métodos Analíticos

La validación de métodos es un requisito importante en la práctica de los análisis químicos, puesto que esta ayudara a obtener una correcta medición y ser capaz de demostrar que el resultado es correcto. Cuando el resultado de un análisis no genera confianza, entonces tiene poco valor y el análisis puede mejor no llevarse a cabo. La validación del método permite a los químicos demostrar que un método es adecuado para el uso previsto. La validación proporciona un conocimiento sólido y experiencia en los detalles prácticos para llevar a cabo el método, incluyendo el conocimiento de las etapas críticas del proceso. La validación da al laboratorio y sus empleados una mayor confianza en sus propios resultados¹¹.

2.8.1. Definición de validación

La validación es el proceso para definir un requisito analítico, y la confirmación de que cuenta con capacidades consistentes con las aplicaciones requeridas¹¹.

La ISO 9000 la define como la confirmación, a través de la aportación de evidencia objetiva, de que se han cumplido los requisitos para un uso o aplicación específico previsto¹¹.

2.8.2. Tipos de métodos analíticos que pueden ser validados

Un método debe ser validado cuando es necesario demostrar que sus características de desempeño son adecuadas para el uso previsto. La discusión de la validación de los procedimientos analíticos está dirigida a los cuatro tipos más comunes de procedimientos analíticos¹⁹:

- Pruebas de identificación: están destinadas a garantizar la identidad de un analito en una muestra. Esto se logra normalmente mediante la comparación de una propiedad de la muestra (por ejemplo, espectro, comportamiento cromatográfico, reactividad química, etc.) con una referencia estándar.



- Pruebas de impurezas: puede ser una prueba cuantitativa o una prueba de límite para la impureza en una muestra. Cualquiera de las pruebas pretende reflejar con precisión las características de pureza de la muestra.
- Procedimientos de ensayo: están destinados a medir el analito presente en una muestra dada. El ensayo representa una medida cuantitativa de los componentes principales en la sustancia del fármaco. Para el producto farmacéutico las características de validación son similares y también se aplican cuando se analizan los componentes activos u otros componentes seleccionados. Las mismas características de validación también pueden aplicarse a ensayos de procedimientos analíticos asociados (por ejemplo, disolución).

Cuando hay cambios significativos, puede ser necesaria una revalidación, por ejemplo, en:

- Cambios en la síntesis de la sustancia farmacológica.
- Cambios en la composición del producto terminado.
- Cambios en el procedimiento analítico.

El grado de revalidación requerido dependerá de la naturaleza de los cambios. Ciertos otros cambios pueden requerir validación completa.

2.8.3. Parámetros de desempeño para la validación de métodos analíticos

El laboratorio tiene que decidir cuáles son las características de desempeño que deben ser investigadas para validar el método y, en algunos casos, el grado de detalle para una característica particular. Cuando el alcance del trabajo de análisis está bien definido y sus aplicaciones son similares en el tiempo, puede ser posible que una organización pueda emitir guías generales para la extensión de las validaciones. En la Tabla 5 se muestra un ejemplo para el sector farmacéutico¹¹.



Tabla 5. Parámetros de desempeño que normalmente se validan en la industria farmacéutica.

Parámetro de desempeño	Tipos de aplicación analítica				
	Ensayo de identificación	Ensayo de cuantificación de impurezas	Identificación de impurezas	Procedimiento de ensayo (Disolución, Contenido)	Ensayo de estabilidad
Selectividad	x	x	x	X	x
Límite de detección		x ¹	x		x
Límite de cuantificación		x			X
Linealidad		x		X	X
Precisión		x ¹	x	x ¹	x
Exactitud		x		X	x
Rango		x		X	x ¹
Robustez		x	x	X	x ¹
1. Se realiza solo en caso de ser necesaria <i>Tabla adaptada de la guía de validación EURACHEM y la ICH Q2</i>					

Selectividad

La selectividad, también llamada en algunos casos especificidad, es el grado en el que un método puede ser utilizado para determinar analitos particulares en mezclas o matrices sin interferencias de otros componentes de comportamiento similar¹¹. La selectividad debe de tener la capacidad de evaluar de manera inequívoca el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes¹⁹. Esta característica tiene que establecer que la propiedad medida sólo se debe al analito y no a algo química o físicamente similar, o que surja como una coincidencia, causando así un sesgo en el resultado de medición¹¹.

Límite de detección

Es la concentración más baja del analito que puede ser detectada por el método a un nivel de confianza especificado¹¹, pero no necesariamente cuantificada como una exacta valor¹⁹.



Límite de cuantificación

Es el nivel más bajo de concentración del analito en el cual el desempeño es aceptable para una aplicación típica¹¹, que puede determinarse cuantitativamente con la precisión y exactitud adecuadas. El límite de cuantificación es un parámetro de los ensayos cuantitativos para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra, y se usa particularmente para la determinación de impurezas y/o productos de degradación¹⁹.

Linealidad

La linealidad de un procedimiento analítico es su capacidad (dentro de un rango determinado) para obtener resultados de prueba que son directamente proporcionales a la concentración (cantidad) de analito en la muestra¹⁹. Este rango de trabajo proporciona resultados con una incertidumbre aceptable. El extremo inferior del intervalo de trabajo está determinado por el límite de cuantificación. El extremo superior del intervalo de trabajo está definido por las concentraciones a las cuales se observan anomalías significativas en la sensibilidad analítica.

Precisión

La precisión de un procedimiento analítico expresa la proximidad de los datos o el grado de dispersión que existe entre una serie de mediciones obtenidas de un muestreo múltiple de la misma muestra homogénea en las condiciones prescritas¹⁹. Es decir, es una medida de cuán cerca están los resultados entre sí. Por lo general, se expresa mediante parámetros estadísticos que describen la propagación de los resultados, típicamente la desviación estándar, calculada a partir de los resultados obtenidos mediante la realización de mediciones repetidas en un material adecuado en condiciones específicas. La precisión es generalmente dependiente de la concentración de analito, y así debe determinarse en una serie de concentraciones a través del intervalo de interés¹¹.

La precisión puede considerarse en tres niveles:

- *Repetibilidad*: expresa la precisión en las mismas condiciones de operación en un corto intervalo de tiempo. La repetibilidad también se denomina precisión intraensayo.
- *Precisión intermedia*: expresa variaciones dentro de los laboratorios: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.



- *Reproducibilidad*: expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos, generalmente aplicada a la estandarización de la metodología).

Exactitud

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la proximidad de los datos entre el valor que se acepta como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado¹⁹. Es una expresión de la proximidad de la media de un número infinito de resultados (producidos con el método) a un valor de referencia¹¹.

Rango

El rango de un procedimiento analítico es el intervalo entre la concentración superior e inferior de analito en la muestra para el cual se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad. El rango validado es el intervalo de concentración de analito dentro del cual el método puede considerarse validado. El rango validado puede tomarse como una extrapolación razonable de estos puntos en la escala de concentración¹⁹.

Robustez

Es una medida de su capacidad para que permanezca el procedimiento analítico sin ser afectado por pequeñas variaciones premeditadas pero deliberadas de los parámetros del método. La robustez proporciona una indicación de la fiabilidad del método durante su uso normal. Un ensayo de robustez implica hacer cambios deliberados en el método, e investigar el efecto subsiguiente en el desempeño¹⁹.



3. Hipótesis

“La elección de las condiciones óptimas del método analítico y su validación por HPLC acoplado a DAD, permite la identificación y cuantificación específica de *trans*-resveratrol ante la exposición de diferentes condiciones de degradación forzada”.



4. Objetivos

4.1. Objetivo general

Desarrollar y validar un método que permita la cuantificación de *trans*-resveratrol por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de arreglo de diodos para evaluar la estabilidad de *trans*-resveratrol en muestras de formulación parenteral.

4.2. Objetivos específicos

- Investigar las propiedades fisicoquímicas de *trans*-resveratrol para determinar las mejores condiciones para su evaluación.
- Buscar información sobre métodos de cuantificación de resveratrol por medio de HPLC reportados en la literatura, para tener referencia de condiciones de trabajo ya establecidas.
- Evaluar la eficiencia y comportamiento en diferentes columnas de separación de HPLC ante el resveratrol, para así elegir la columna más estable y con mejor respuesta.
- Definir las condiciones óptimas para la separación, detección y cuantificación de resveratrol por medio de HPLC acoplado a DAD.
- Validar el método analítico para evaluar la estabilidad de resveratrol en formulación parenteral de acuerdo con los criterios establecidos por la guía ICH2 y EURACHEM.
- Desarrollar un método indicativo de estabilidad para establecer el comportamiento de *trans*-resveratrol en formulación parenteral bajo diferentes condiciones de oxidación, temperatura y luz, para determinar la estabilidad del estándar de resveratrol y de la formulación.



5. Desarrollo experimental

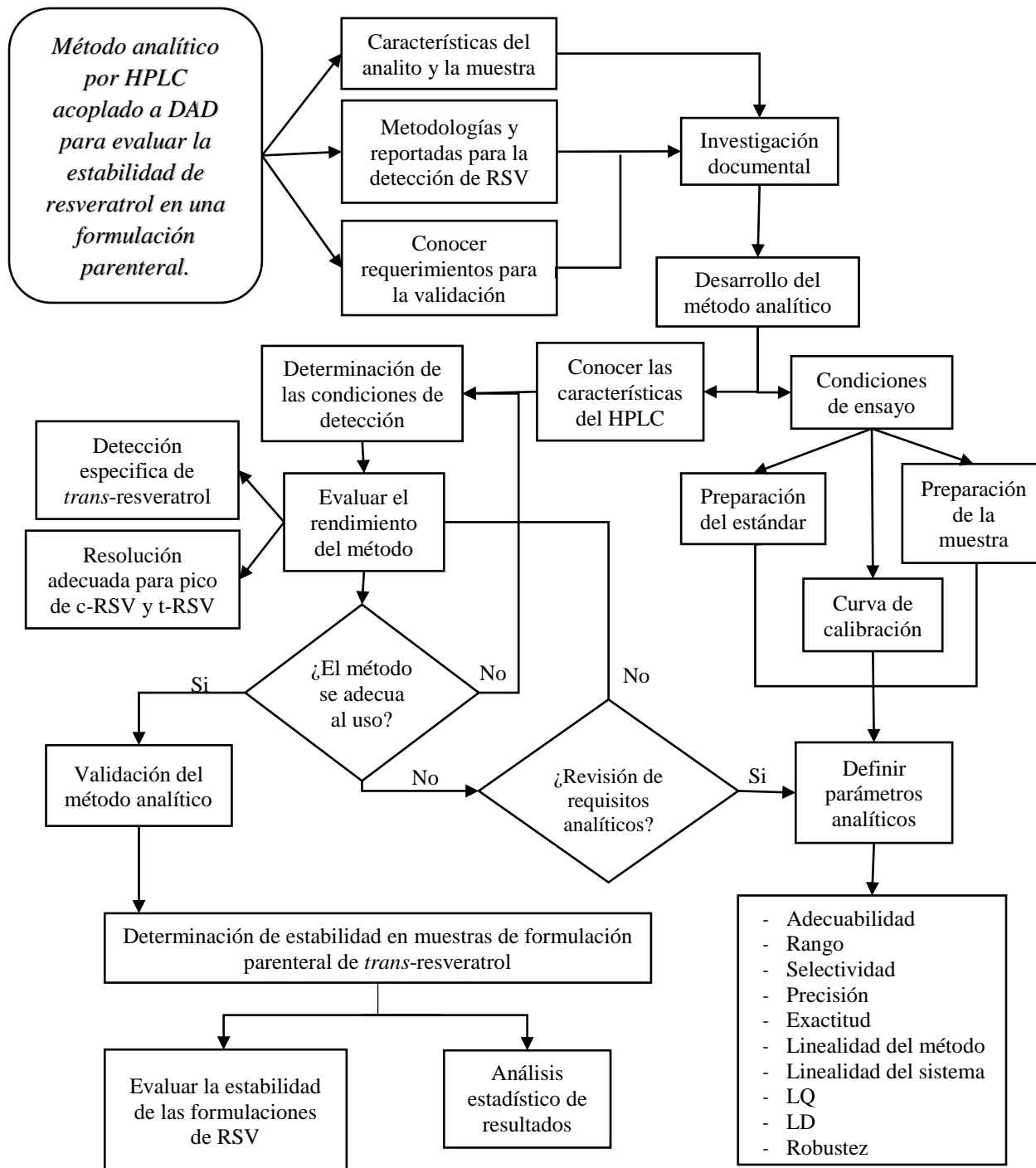


Figura 23. Diagrama metodológico.

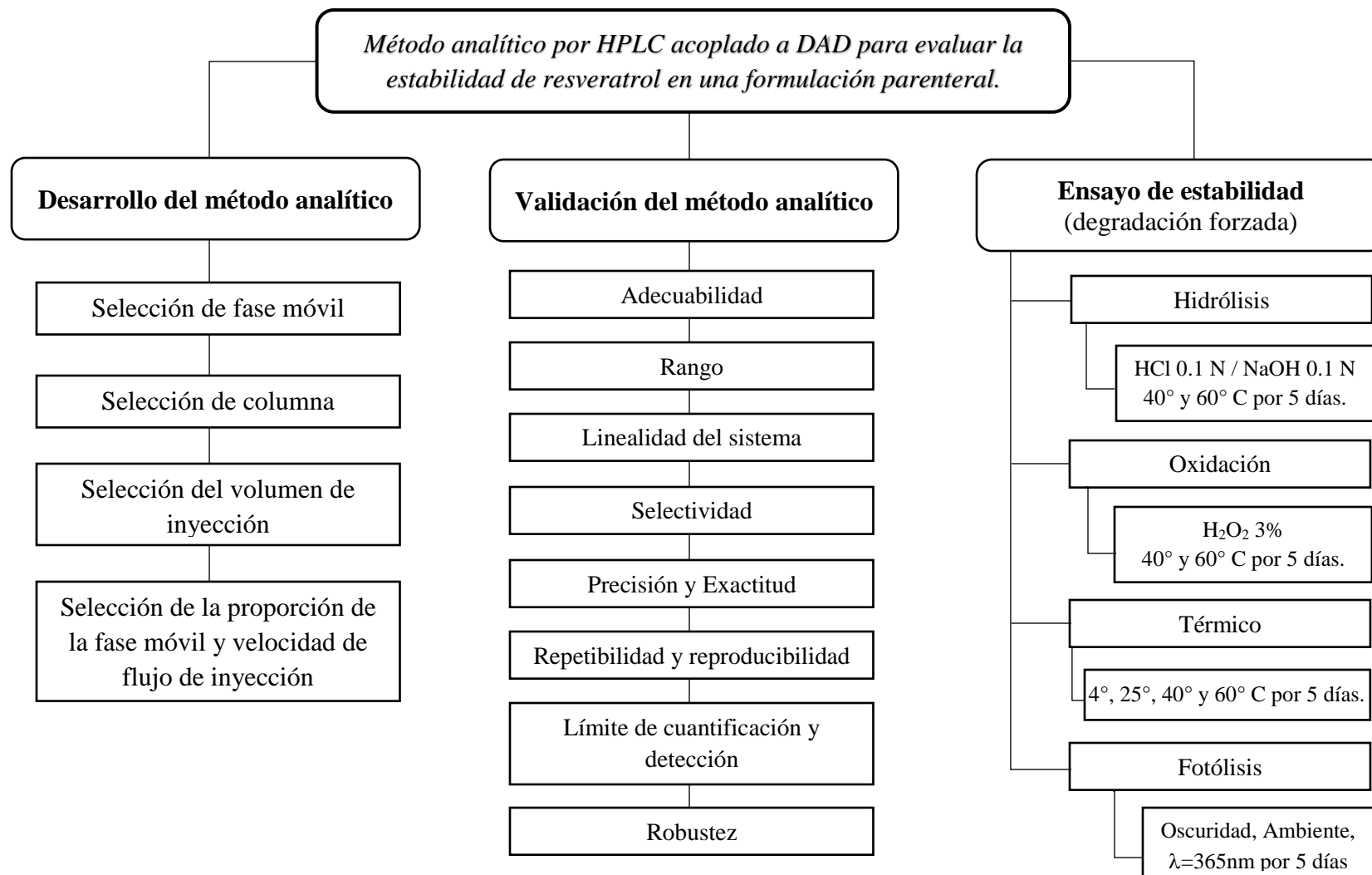


Figura 24. Actividades experimentales realizadas



5.1. Reactivos, sustancias, instrumentos y equipos

5.1.1. Sustancias analizadas

- Resveratrol al 99% de pureza, marca Sigma, lote SLBV8562
- Resveratrol materia prima al 50% de pureza marca Alephqui, lote CHZ-A-709224
- Formulaci3n parenteral No. 2, con 3.5 mg de t-RSV, desarrollada en Laboratorio LEDEFAR
- Placebo de formulaci3n parenteral No. 2, desarrollada en Laboratorio LEDEFAR
- Formulaci3n parenteral No. 16, con 3.5 mg de t-RSV, desarrollada en Laboratorio LEDEFAR
- Placebo de formulaci3n parenteral No. 16, desarrollada en Laboratorio LEDEFAR

5.1.2. Sustancias y reactivos

- Agua Tipo I de resistividad 18.2 M Ω . cm a 25°C, Milli Q, equipo marca Millipore
- Formiato de Amonio al 99.0% de pureza, marca Sigma-Aldrich, lote: bcbv1667
- 1cido F3rmico grado RA al 89.2% de pureza, marca Tecsiquim, lote: 629251
- Acetonitrilo grado HPLC, al 99.9% de pureza, marca Fermont, lote 718361
- Metanol grado ACS al 99.9% de pureza, marca Fermont, lote 718361
- Etanol grado ACS, al 99.9% de pureza, marca Fermont, lote 739431
- Hidr3xido de potasio escamas, al 98.4% de pureza, marca J. T. Baker, lote M30C72
- 1cido clorh3drico grado RA, al 37.8% de pureza, marca J. T. Baker, lote X15C05
- Per3xido de hidr3geno grado ISO, al 31% de pureza, marca Fermont, lote 705441
- 1cido ac3tico glacial, grado RA, al 99.9% de pureza, marca J. T. Baker, lote 9508-05

5.1.3. Instrumentos y Equipos

- Balanza Analtica marca OHAUS, modelo AP250D, No. De serie: 1114050584
- Agitador magn3tico marca IKA, modelo Ika-Werke RO10PS1
- Potenci3metro Seven Multi, marca Mettler Toledo GmbH, modelo Seven-Multi, n3mero de serie: 1227257138
- C1mara UV (UVP) Modelo UVLS-24
- Ultrasonicador marca Elma, modelo Elmasonic S 40 H, n3mero de serie: 101100102.



- Columna Halo® C18 (3.0 x 75 mm, 2.7 µm, USA)
- Columna Agilent® Zorbax Rapid Resolution High Definition (RRHD) SB-C18 (4.6 x 50 mm, 1.8 µm, USA)
- Columna Inertsil® ODS-3 C18 (33 x 46 mm, 3 µm, India)
- Columna Phenomenex® Luna C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm, USA)
- Columna Agilent® Zorbax Eclipse XDB C8 (4.6 x 50 mm, 1.8 µm, USA)
- Columna Waters® Symetry C18 (4.6 x 75 mm, 3.5 µm, Irlanda) No. De serie: W23431X 020
- Columna Waters® Symetry C18 (4.6 x 75 mm, 3.5 µm, Irlanda) No. De serie: W3258IT 016
- Columna Waters® Symetry C18 (4.6 x 75 mm, 3.5 µm, Irlanda) No. De serie: W22121V 041
- Equipo de HPLC Waters, de Especificaciones: Bomba cuaternaria Waters 616 Pump, modelo código 616, número de serie MX6CM8678M; Sistema controlador de entrega de multisolvente Waters 600 Controller, modelo código 6CE, número de serie SX5PM0854R; Automuestrador Waters 717 plus Autosampler, modelo código 717P, número de serie MX60M1849M; Detector Arreglo de diodos marca Waters 996, modelo código 996, número de serie MX5NM689M. Software Empowers 2.0
- Equipo de UPLC Acquity, clase H, Waters de Especificaciones: Sistema controlador de entrega de multisolvente cuaternario Waters, código 1860150018, número de serie J12QSM004A; Automuestrador Waters FNT, código 186015017, número de serie K125SDI127G; Horno de columna CHA, código 186015042, número de serie J12CHA552G; Detector Arreglo de diodos marca Waters PDA eλ UPL, código 18G015033, número de serie G12UPL942A. Software Empowers 3.0.
- Horno MAPSA, modelo HDP-433, número de serie 180701.
- Horno Felisa, modelo 133, número de serie 0.97



5.2. Desarrollo del método analítico

5.2.1. Selección de la fase móvil

Con la columna Halo® C18 (3.0 x 75 mm, 2.7 µm, USA) se probaron las composiciones de fase móvil que se expresan en la Tabla 6.

Tabla 6. Composición de las fases móviles utilizadas.

Fase Móvil	Solvente A	Proporción (%A)	Solvente B	Proporción (%B)
1	Metanol	60	Ácido acético 0.25% pH=4	40
2	Acetonitrilo	30		70
3		30	Agua/Metanol (50:50)	70
4		60	Formiato de amonio 10 mM, pH=4	40
5	Acetonitrilo/Agua/Metanol (95/2.5/2.5)	30	Ácido acético 0.25% pH=4	70
6	acidificado a pH=4 con Ácido acético 0.25%	60	Formiato de amonio 10 mM, pH=4	40

Para el análisis se utilizó un flujo de 0.3 mL/min y un volumen de inyección de 10 µL. La solución para inyectar contenía 21 µg/mL de resveratrol materia prima. Para obtener la respuesta de los cromatogramas se utilizó una longitud de onda de 307 nm.

5.2.2. Selección de la columna

Para la elección se evaluaron 6 columnas diferentes:

- Halo® C18 (3.0 x 75 mm, 2.7 µm, USA)
- Agilent® Zorbax RRHD SB-C18 (4.6 x 50 mm, 1.8 µm, USA)
- Inertsil® ODS-3 C18 (33 x 46 mm, 3 µm, India)
- Phenomenex® Luna C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm, USA)
- Agilent® Zorbax Eclipse XDB C8 (4.6 x 50 mm, 1.8 µm, USA)
- Waters® Symetry C18 (4.6 x 75 mm, 3.5 µm, Irlanda)



Para el análisis se utilizó fase móvil Acetonitrilo: Formiato de amonio 10 mM pH=4 (60:40), acondicionando el flujo para cada columna a una presión de 1200 psi, con un volumen de inyección de 10 μ L. La solución para inyectar contenía 21 μ g/mL de resveratrol materia prima. Para obtener la lectura de los cromatogramas se utilizó una longitud de onda de 307 nm.

5.2.1. Selección del volumen de inyección

Se realizó una prueba de linealidad de volumen de inyección, con el fin de verificar que el volumen de inyección utilizado no influía o causaba alteraciones en la respuesta obtenida.

Para el análisis se utilizó fase móvil Acetonitrilo: Formiato de amonio 10 mM pH=4 (60:40), acondicionando el flujo de 0.8 mL/min. La solución para inyectar contenía 21 μ g/mL de resveratrol materia prima. Los volúmenes de inyección utilizados fueron 2.5, 5, 10, 15, 20, 25 y 30 μ L, para cada uno se inyectó la solución de resveratrol por triplicado. Para obtener la lectura de los cromatogramas se utilizó una longitud de onda de 307 nm.

5.2.1. Selección de la proporción de la fase móvil y velocidad de flujo de inyección

Para obtener una mejor resolución entre el resultado de pico de t-RSV y c-RSV, en la fase móvil Acetonitrilo: Formiato de Amonio 10 mM, pH=4, se realizaron variaciones en su velocidad de flujo, las cuales se muestran en la Tabla 7.

La solución para inyectar contenía 21 μ g/mL de resveratrol materia prima sometidos a luz ultravioleta a una longitud de onda de 254 nm durante 7 días. El volumen de inyección fue de 10 μ L. Para obtener la lectura de los cromatogramas se utilizó una longitud de onda de 307 nm.



Tabla 7. Variación de composición y flujo de la fase móvil.

Fase Móvil	Flujo (mL/min)	Formiato de amonio 10 mM pH=4 (%)	Acetonitrilo (%)
a	0.8	75	25
b	0.7		
c	0.9	70	30
d	0.8		
e	0.7		
f	0.9	65	35
g	0.8		
h	0.7		
i	0.8		
j	0.7	60	40
k	0.8		
l	0.7	55	45

En la Tabla 8 se muestran las condiciones cromatográficas para la validación del método indicativo de estabilidad de resveratrol.

Tabla 8. Condiciones cromatográficas para la validación del método de trans-resveratrol.

Condiciones cromatográficas	
Columna	Waters® Symetry C18 (4.6 x 75 mm, 3.5 µm, Irlanda) No. De serie: W23331X 020
Temperatura de la columna	Temperatura ambiente
Longitud de onda	307 nm
Fase móvil	Formiato de amonio 10 mM, pH=4: Acetonitrilo (70:30)
Flujo	0.9 mL/min
Volumen de inyección	10 µL
Tiempo de retención	2.69 min.



5.3. Validación del método analítico

Para la validación del método analítico se tomaron en cuenta los procedimientos y los parámetros de validación establecidos en la guía ICH Q2 y la guía EURACHEM.

5.3.1. Adecuabilidad

Se determinó mediante la inyección de 10 μL por sextuplicado de una solución estándar de *trans*-resveratrol a una concentración correspondiente al 100% del analito.

Las especificaciones para considerar fueron:

- Factor de coeio con promedio menor a 2.
- Factor de capacidad con promedio mayor a 2.
- Tiempo de retención con coeficientes de variación menor a 2%.
- Numero de platos
- Área con coeficientes de variación menor a 2%.

5.3.2. Rango

El parámetro de rango se evaluó con el fin de definir el intervalo en el que el método analítico es lineal, a partir del mismo se determinaron el intervalo de concentraciones aplicables para la linealidad del sistema.

Se determinó mediante 7 niveles de concentración por triplicado, que comprendió entre concentraciones de 0.125 a 64 $\mu\text{g/mL}$ de una solución estándar de resveratrol.

Los criterios de aceptación fueron:

- $r > 0.998$
- $r^2 > 0.995$
- IC (b_0) Incluye a 0



5.3.3. Linealidad del sistema

Se realizó una curva de calibración de 6 niveles por triplicado y de forma independiente de soluciones estándar de resveratrol (0.525, 1.05, 2.1, 4.2, 8.4 y 16.8 $\mu\text{g/mL}$).

Los criterios de aceptación fueron:

- $r > 0.998$
- $r^2 > 0.995$
- C.V. $< 2\%$
- IC (b_0) Incluye a 0
- IC (b_1) No incluye a 0

5.3.4. Selectividad

Para esta prueba se evaluaron diferentes soluciones por triplicado en las cuales se encontraba ausente el analito de interés, muestras con el producto a evaluar, placebos del producto y muestras del producto sometidas a degradación forzada para generar productos de degradación, con el fin de demostrar que la respuesta cuantificable no era afectada por excipientes o algún producto de degradación. Las muestras fueron las siguientes.

- Blanco: solución de preparación la cual contienen etanol: agua (50: 50)
- Estándar: solución de resveratrol estándar con concentración al 100% del analito.
- Placebo de Formulación parenteral 2 (F2) y Formulación parenteral 16 (F16)
- Placebo adicionado de F2 y F16 con concentración al 100% del analito
- Muestra expuesta por luz UV a una longitud de onda de 365 nm por 24 horas de F2 y F16
- Muestra expuesta NaOH 0.1 N por 24 horas de F2 y F16
- Muestra expuesta HCl 0.1 N por 24 horas de F2 y F16
- Muestra expuesta H_2O_2 al 3% por 24 horas de F2 y F16
- Muestra expuesta por 60°C por 24 horas de F2 y F16

Criterio de aceptación: No debe de existir respuesta analítica en el tiempo de retención del analito.



5.3.5. Precisión y Exactitud

Se consideraron 3 niveles de concentración, 80, 100 y 120%, de placebo adicionado de resveratrol, preparados por sextuplicado y de forma independiente.

Criterios de aceptación:

- Porcentaje de recuperación en un intervalo del 98.0 al 102.0%.
- IC (b_1) Incluye a 1
- CV de porcentaje de recobro menor 2%.

5.3.6. Linealidad del método

Se evaluó mediante una curva de calibración por triplicado, con 5 niveles de concentración, en un intervalo del 80 al 120% por triplicado de placebos cargados de Resveratrol, las cuales fueron preparadas de forma independiente y por pesadas individuales.

Criterios de aceptación:

- Porcentaje de recuperación en un intervalo del 98.0 al 102.0%.
- $r > 0.998$
- $r^2 > 0.995$
- C.V. < 2%
- IC (b_0) Incluye a 0
- IC (b_1) Incluye a 1

5.3.7. Repetibilidad y reproducibilidad

Se evaluó mediante determinación de placebo cargado al 100%, el cual fue preparado por sextuplicado de manera independiente, en días diferentes, por 2 analistas, utilizando el mismo método e instrumentos.

Criterios de aceptación:

- Porcentaje de recuperación en un intervalo del 98.0 al 102.0%.
- CV de porcentaje de recobro menor 2 %.



5.3.8. Límite de cuantificación y detección

Existen varios enfoques para la determinación del límite de cuantificación y el límite de detección. En este caso se determinó mediante la desviación estándar de la regresión y el valor de la pendiente; y la desviación estándar de la ordenada al origen de la regresión y el valor de la pendiente, ambas de la curva de calibración del sistema.

En el caso del método por desviación estándar de la regresión y el valor de la pendiente se utilizaron las siguientes formulas:

- Límite de detección $LD = \frac{3.3 \times S_{y/x}}{b_1}$
- Límite de cuantificación $LC = \frac{10 \times S_{y/x}}{b_1}$

En el caso del método por desviación estándar de la ordenada al origen de la regresión y el valor de la pendiente se utilizaron las siguientes formulas:

- Límite de detección $LD = \frac{3.3 \times S_{b0}}{b_1}$
- Límite de cuantificación $LC = \frac{10 \times S_{b0}}{b_1}$

5.3.9. Robustez

Para conocer si el método que permite determinar el t-RSV es robusto, se realizaron las siguientes modificaciones planteadas en la Tabla 9. Para la evaluación se analizaron 6 placebos cargados correspondientes al 100% del analito para cada factor.



Tabla 9. Factores evaluados para robustez.

Variables de estudio	Nivel		
	Bajo	Normal	Alto
Volumen de inyección	9 mL	10 mL	11 mL
Fase Móvil Formiato de amonio 10 mM pH=4 (FA)/Acetonitrilo (ACN)	FA: ACN (69:31)	FA: ACN (70:30)	FA: ACN (71:29)
pH de Fase Móvil FA	pH=3	pH=4	pH=5
No. De serie de columna: Symetry C18 3.5 mm 4.6 x75 mm Part. No. WAT066224	W22121V 041	W23331X 020	W32581T 016
Sistema cromatográfico	UPLC Waters	HPLC Waters	-

Criterios de aceptación:

- La diferencia absoluta de la media aritmética del contenido para cada valor evaluado no debe ser mayor del 2%.



5.4. Ensayo de estabilidad

Con el fin de verificar que el método desarrollado y validado anteriormente por HPLC (Tabla 8 y Tabla 27), es útil para su uso, se desarrolló un estudio indicativo de estabilidad, para el cual se establecieron las condiciones mencionadas en la Tabla 10 y para cada condición se prepararon diluciones por triplicado de *trans*-resveratrol estándar, Formulación 2 y Formulación 16 hasta llegar a una concentración de 4.2 µg/mL, la cual fue tomada como el 100% del analito. Las soluciones fueron envasadas en envases de vidrio de 10 mL de boca chica y tapón de rosca de plástico. Para su análisis se tomaron en cuenta las condiciones mencionadas anteriormente.

Tabla 10. Condiciones del método indicativo de estabilidad.

Tipo de degradación	Condición Experimental	Condición de almacenado	Tiempos de muestreo
Hidrólisis	HCl 0.1 N	40°C, 60°C	1, 3 y 5 días
	HCl 0.1 N Control		
	NaOH 0.1 N		
	NaOH 0.1 N Control		
	Formulación Control		
Oxidación	H ₂ O ₂ 3%	40°C, 60°C	1, 3 y 5 días
	Peróxido control		
Fotólisis	Luz: Oscuridad	No Aplica	1, 3 y 5 días
	Luz 3: λ=365 nm		
	Luz: Ambiente		
Térmico	Cámara de calor 1	60° C	1, 3 y 5 días
	Cámara de calor 2	40° C	
	Cámara de calor 3	25° C (Ambiente)	
	Cámara de calor 4	4° C	



5.4.1. Degradación forzada de resveratrol por hidrólisis

Para la evaluación de *trans*-resveratrol estándar (STD), formulación parenteral 2 (F2) y Formulación parenteral 16 (F16) en degradación forzada por hidrólisis, se dividió en 5 grupos:

- HCl 0.1 N: es degradación por hidrólisis ácida para la cual se prepararon disoluciones de t-RSV STD, F2 y F16 a una concentración de 4.2 µg/mL, preparadas con ácido clorhídrico de concentración 0.1 N, pH=1. Esta concentración fue considerada como el 100% del analito. Las soluciones fueron envasadas en envases de vidrio de 10 mL de boca chica y tapón de rosca de plástico. Los envases fueron sometidas a hornos termostáticos a temperaturas de 40°C y 60°C para diferentes intervalos de tiempo (1, 3 y 5 días).
- HCl 0.1 N Control: para este grupo se utilizó la misma solución de ácido clorhídrico 0.1 N, pH=1, con la cual se prepararon los sistemas del grupo HCl 0.1N, pero sin agregar analito, los cuales fueron sometidos a 40° y 60° en envases de vidrio de 10 mL de boca chica y tapón de rosca de plástico, para diferentes intervalos de tiempo (1, 3 y 5 días). Este grupo fue generado para verificar que no se generaran picos de respuesta que causen interferencia al resultado del grupo HCl 0.1 N.
- NaOH 0.1 N: es degradación por hidrólisis básica para la cual se prepararon disoluciones de t-RSV STD, F2 y F16 una concentración 4.2 µg/mL, preparadas con hidróxido de sodio de concentración 0.1 N, pH=14. Esta concentración fue considerada como el 100% del analito. Las soluciones fueron envasadas en envases de vidrio de 10 mL de boca chica y tapón de rosca de plástico. Los envases fueron sometidas a hornos termostáticos a temperaturas de 40°C y 60°C para diferentes intervalos de tiempo (1, 3 y 5 días).
- NaOH 0.1 N Control: para este grupo se utilizó la misma solución de hidróxido de sodio pH=14, con la cual se prepararon los sistemas del grupo NaOH 0.1N, pero sin agregar analito, los cuales fueron sometidos a 40° y 60° en envases de vidrio de 10 mL de boca chica y tapón de rosca de plástico, para diferentes intervalos de tiempo (1, 3 y 5 días). Este grupo fue generado para verificar que no se generaran picos de respuesta que causen interferencia al resultado del grupo NaOH 0.1 N.



- **Formulación Control:** para este grupo se prepararon disoluciones de t-RSV STD, F2 y F16 una concentración 4.2 $\mu\text{g/mL}$, preparadas con solución de etanol: agua (50:50). Esta concentración fue considerada como el 100% del analito. Las soluciones fueron envasadas en envases de vidrio de 10 mL de boca chica y tapón de rosca de plástico. Los envases fueron sometidas a hornos termostáticos a temperaturas de 40°C y 60°C para diferentes intervalos de tiempo (1, 3 y 5 días). Este grupo es contemplado como referencia para evaluar las diferencias de los diferentes productos de degradación con los grupos de HCl 0.1 N y NaOH 0.1 N.

Para el análisis de cinética de cada solución, de cada grupo del método indicativo de estabilidad se midió la concentración de t-RSV a tiempo cero (día 0) y posteriormente se midió la concentración de t-RSV para cada temperatura, en cada intervalo de tiempo, 24, 72, 120 horas, para lo cual se tomaron los envases y fueron enfriados a temperatura ambiente, se tomaba 1 mL de la solución y se inyectaba al sistema de HPLC.

5.4.2. Degradación forzada de resveratrol por oxidación

Para la evaluación de *trans*-resveratrol estándar (STD), formulación parenteral 2 (F2) y Formulación parenteral 16 (F16) en degradación forzada por oxidación, se divide en 2 grupos:

- **H₂O₂ 3%:** es degradación por oxidación para la cual se prepararon disoluciones de t-RSV STD, F2 y F16 una concentración 4.2 $\mu\text{g/mL}$, preparadas con peróxido de hidrógeno a concentración del 3%. Esta concentración fue considerada como el 100% del analito. Las soluciones fueron envasadas en envases de vidrio de 10 mL de boca chica y tapón de rosca de plástico. Los envases fueron sometidas a hornos termostáticos a temperaturas de 40°C y 60°C para diferentes intervalos de tiempo (1, 3 y 5 días).
- **Peróxido Control:** para este grupo se utilizó la misma solución de peróxido de hidrógeno al 3%, con la cual se prepararon los sistemas del grupo, pero sin agregar analito, los cuales fueron sometidos a 40° y 60° en envases de vidrio de 10 mL de boca chica y tapón de rosca de plástico, para diferentes intervalos de tiempo (1, 3 y 5 días). Este grupo fue generado



para verificar que no se generaran picos de respuesta que causen interferencia al resultado del grupo H₂O₂ 3%.

Para el análisis de cinética de cada solución, de cada grupo del método indicativo de estabilidad se midió la concentración de t-RSV a tiempo cero (día 0) y posteriormente se midió la concentración de t-RSV para cada temperatura, en cada intervalo de tiempo, 24, 72, 120 horas, para lo cual se tomaron los envases y fueron enfriados a temperatura ambiente, se tomaba 1 mL de la solución y se inyectaba al sistema de HPLC.

5.4.3. Degradación forzada de resveratrol por fotólisis

Para la evaluación de *trans*-resveratrol estándar (STD), formulación parenteral 2 (F2) y Formulación parenteral 16 (F16) en degradación forzada por fotólisis, se divide en 3 grupos:

- Luz: Oscuridad: para este grupo se prepararon disoluciones de t-RSV STD, F2 y F16 una concentración 4.2 µg/mL, preparadas con solución de etanol: agua (50:50). Esta concentración fue considerada como el 100% del analito. Las soluciones fueron envasadas en envases de vidrio de 10 mL de boca chica y tapón de rosca de plástico. Los envases fueron resguardados en un cuarto cerrado, sin paso de la luz ambiental para diferentes intervalos de tiempo (1, 3 y 5 días).
- Luz: Ambiente: para este grupo se prepararon disoluciones de t-RSV STD, F2 y F16 una concentración 4.2 µg/mL, preparadas con solución de etanol: agua (50:50). Esta concentración fue considerada como el 100% del analito. Las soluciones fueron envasadas en envases de vidrio de 10 mL de boca chica y tapón de rosca de plástico. Los envases fueron puestos en un cuarto con luz ambiental para diferentes intervalos de tiempo (1, 3 y 5 días).
- Luz: λ=365 nm: se prepararon disoluciones de t-RSV STD, F2 y F16 a una concentración 4.2 µg/mL, preparadas con solución de etanol: agua (50:50). Esta concentración fue considerada como el 100% del analito. Las soluciones fueron envasadas en envases de



vidrio de 10 mL de boca chica y tapón de rosca de plástico. Los envases fueron colocados en una cámara de luz a una longitud de onda de 365 nm para diferentes intervalos de tiempo (1, 3 y 5 días).

Para el análisis de cinética de cada solución, de cada grupo del método indicativo de estabilidad se midió la concentración de t-RSV a tiempo cero (día 0) y posteriormente se midió la concentración de t-RSV para cada temperatura, en cada intervalo de tiempo, 24, 72, 120 horas, para lo cual se tomaron los envases y fueron enfriados a temperatura ambiente, se tomaba 1 mL de la solución y se inyectaba al sistema de HPLC.

5.4.4. Degradación forzada de resveratrol térmica

Para la evaluación de *trans*-resveratrol estándar (STD), formulación parenteral 2 (F2) y Formulación parenteral 16 (F16) en degradación forzada por condición térmica, se divide en:

- Grupo 1: para este grupo se prepararon disoluciones de t-RSV STD, F2 y F16 una concentración 4.2 µg/mL, preparadas con solución de etanol: agua (50:50). Esta concentración fue considerada como el 100% del analito. Las soluciones fueron envasadas en envases de vidrio de 10 mL de boca chica y tapón de rosca de plástico. Los envases fueron sometidas a un horno termostático a temperatura de 60°C para diferentes intervalos de tiempo (1, 3 y 5 días).
- Grupo 2: para este grupo se prepararon disoluciones de t-RSV STD, F2 y F16 una concentración 4.2 µg/mL, preparadas con solución de etanol: agua (50:50). Esta concentración fue considerada como el 100% del analito. Las soluciones fueron envasadas en envases de vidrio de 10 mL de boca chica y tapón de rosca de plástico. Los envases fueron sometidas a un horno termostático a temperaturas de 40° para diferentes intervalos de tiempo (1, 3 y 5 días).
- Grupo 3: para este grupo se prepararon disoluciones de t-RSV STD, F2 y F16 una concentración 4.2 µg/mL, preparadas con solución de etanol: agua (50:50). Esta



concentración fue considerada como el 100% del analito. Las soluciones fueron envasadas en envases de vidrio de 10 mL de boca chica y tapón de rosca de plástico. Los envases fueron colocados en un cuarto a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1$ (ambiente) para diferentes intervalos de tiempo (1, 3 y 5 días).

- Grupo 4: para este grupo se prepararon disoluciones de t-RSV STD, F2 y F16 una concentración $4.2 \mu\text{g/mL}$, preparadas con solución de etanol: agua (50:50). Esta concentración fue considerada como el 100% del analito. Las soluciones fueron envasadas en envases de vidrio de 10 mL de boca chica y tapón de rosca de plástico. Los envases fueron colocados en refrigeración a una temperatura de 4°C para diferentes intervalos de tiempo (1, 3 y 5 días).

Para el análisis de cinética de cada solución, de cada grupo del método indicativo de estabilidad se midió la concentración de t-RSV a tiempo cero (día 0) y posteriormente se midió la concentración de t-RSV para cada temperatura, en cada intervalo de tiempo, 24, 72, 120 horas, para lo cual se tomaron los envases y fueron enfriados a temperatura ambiente, se tomaba 1 mL de la solución y se inyectaba al sistema de HPLC.



6. Resultados y discusión

6.1. Desarrollo del método analítico

6.1.1. Selección de la fase móvil.

Los resultados promedios de los parámetros obtenidos en la selección de fase móvil se muestran en la Tabla 11, en las Figura 25 se puede observar una comparación de cromatogramas y en la Figura 26 los espectros de las fases móviles utilizadas.

Tabla 11. Resultados promedios cromatográficos de selección de la fase móvil obtenidos con la columna Halo® C18.

FM	Proporción	tr (min)	Área	Altura	Ancho (seg.)	K'	Coleo	Abs (nm)
1	Metanol: Ácido acético 0.25% pH=4 (60:40)	2.08	469340	120078	87	3.15	2.51	302.2
2	Acetonitrilo: Ácido acético 0.25% pH=4 (30:70)	2.70	559803	83229	135	4.40	2.97	304.6
3	Acetonitrilo: Agua/Metanol (50/50) (30:70)	2.74	761413	168849	120	4.50	2.76	303.3
4	Acetonitrilo: Formiato de amonio 10 mM pH=4 (60:40)	1.67	873672	196392	81	2.35	1.80	307.0
5	Acetonitrilo/Agua/Metanol acidificado a pH=4 con Ácido acético 0.25% (95/2.5/2.5): Ácido acético 0.25% pH=4 (30:70)	2.70	546740	93257	126	4.41	2.98	304.6
6	Acetonitrilo/Agua/Metanol acidificado a pH=4 con Ácido acético 0.25% (95/2.5/2.5): Formiato de amonio 10 mM pH=4 (60:40)	1.71	802682	17483	90	2.36	2.39	305.8

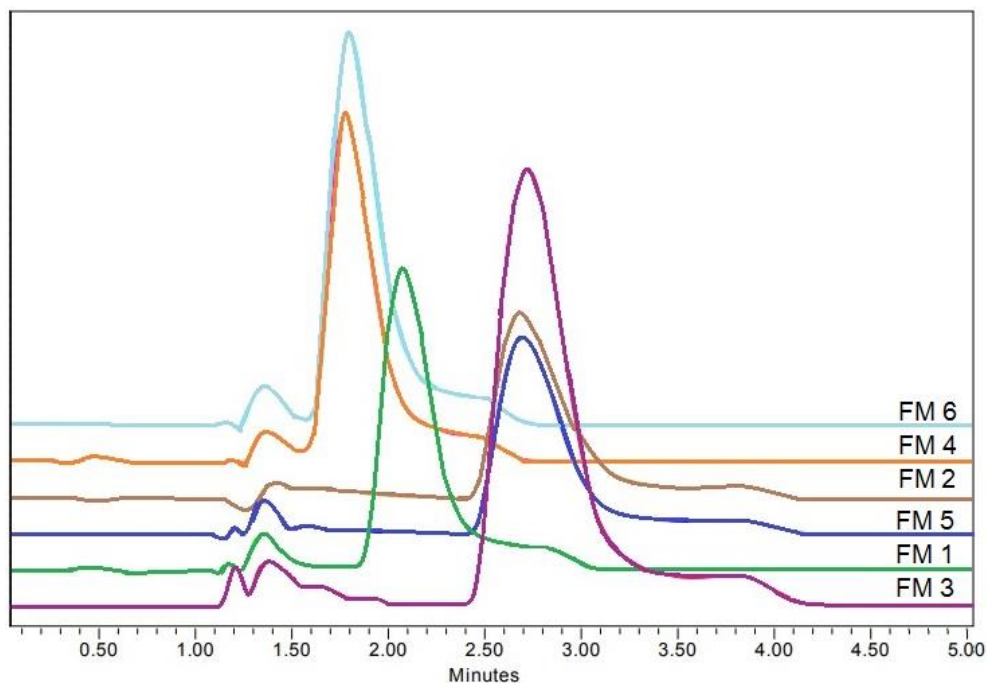


Figura 25. Comparación de cromatogramas de *t*-RSV en la selección de fase móvil.

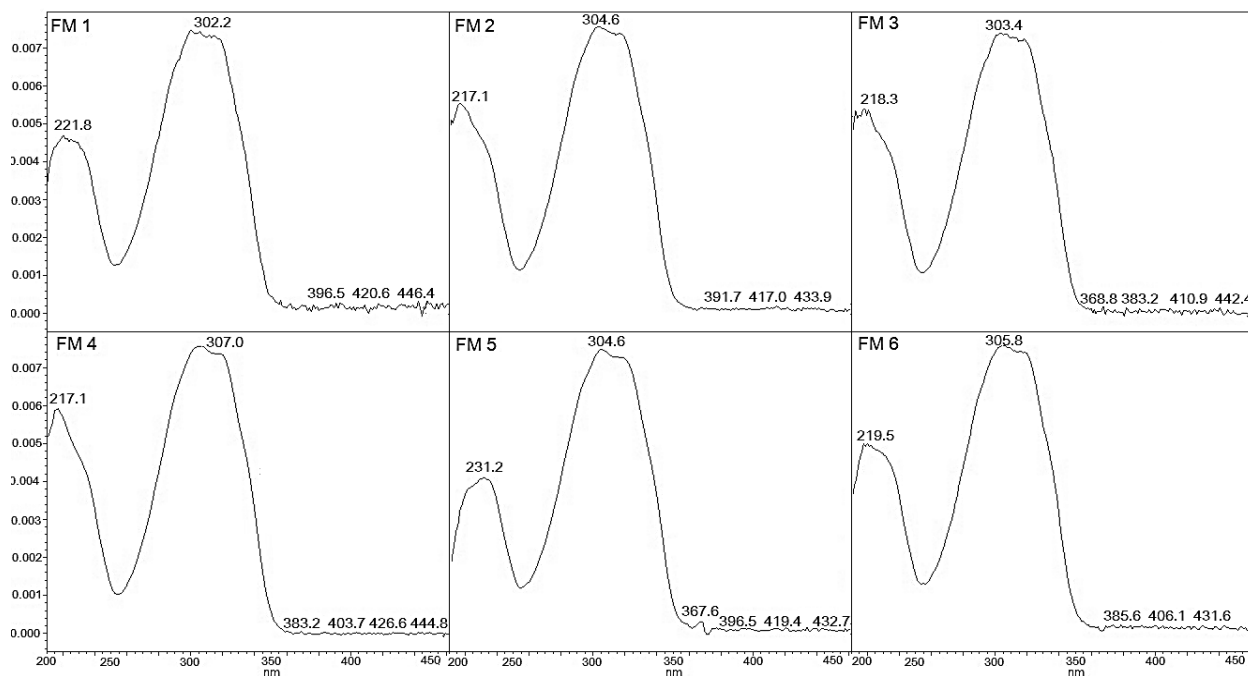


Figura 26. Comparación de espectros de *t*-RSV en la selección de fase móvil.



La FM 1, que está conformada por Metanol: Ácido acético 0.25% pH=4 (60:40), presentó tiempo de retención igual a 2.08 min., área de 469340, ancho de 87 segundos, y un coleo de 2.51, sin embargo, sus valores no presentaban repetibilidad, el pico es asimétrico y no tiene un final bien definido, además de presentar la menor absorbancia máxima de lectura (302.2 nm). La FM 2, Acetonitrilo: Ácido acético 0.25% pH=4 (30:70), presento una absorbancia máxima de 304.6 nm, el tiempo de retención fue estable (2.70 min), pero el área y altura no, el pico es asimétrico, el valor de ancho fue de 135 segundos siendo el valor más grande, en comparación de las otras fases móviles y el valor de coleo fue de coleo 2.96. La FM 3, formada por Acetonitrilo: Agua/Metanol (50/50) (30:70), se observa mucho ruido en el espectro del analito, con una absorbancia máxima de 303.3 nm, sin embargo, el pico es más simétrico, con una respuesta de área de 761413, un tiempo de retención de 2.75 min y un valor de coleo de 2.76. La FM 4, que está compuesta por Acetonitrilo: Formiato de amonio 10 mM, pH=4 (60:40), presento un tiempo de retención estable, con un valor de 1.67 min., la respuesta más alta de área 873672 y de absorbancia máxima de 307.0 nm, semejante al reportado en la literatura²⁹, con respecto al pico es más simétrico, presenta el menor valor de ancho, de 81 segundos, y su coleo es de 1.80. Para la FM 5 Acetonitrilo/Agua/Metanol acidificado a pH=4 con Ácido acético 0.25% (95/2.5/2.5): Ácido acético 0.25% pH=4 (30:70), presento una absorbancia máxima de 304.6 nm, tiempo de retención es estable (2.70 min.), el pico es más simétrico, con una respuesta de área de 546740, un ancho de 124 segundos y coleo igual a 2.98. Por último, la FM6, compuesta por Acetonitrilo/Agua/Metanol acidificado a pH=4 con Ácido acético 0.25% (95/2.5/2.5): Formiato de amonio 10 mM pH=4 (60:40), presento un tiempo de retención es estable (1.71 min), el pico es más simétrico, con una respuesta de área de 802682, un ancho 90 segundos y un valor de coleo de 2.39.

La fase elegida fue Acetonitrilo: Formiato de amonio 10 mM pH=4 (60:40), por presentar tiempo de retención, área, altura y ancho de pico estable, además de que el pico es más simétrico, es el menos ancho, con mayor respuesta de área y por presentar el mejor espectro de absorción, en comparación con las demás fases móviles utilizadas.



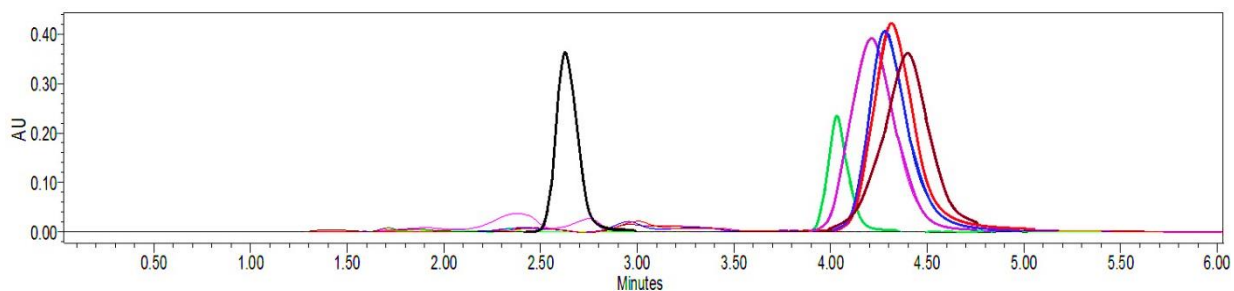
6.1.2. Selección de la columna

La Tabla 12 muestra los resultados cromatográficos obtenidos de cada columna y en la Figura 27 se encuentra una comparación de los cromatogramas. Se puede observar que para alcanzar una presión de 1200 psi en el cromatógrafo se requirieron de 2 velocidades de flujo de fase móvil, una de 0.2 mL/min, que utilizó la columna Zorbax C18, ODS-3 y la columna Zorbax C8, mientras que las columnas Luna C18, Halo C18 y Symmetry C18 requirieron un flujo de 0.8 mL/min. Las columnas con las que se obtuvo menor tiempo de retención fue Symmetry C18, con 2.63 min., seguida de Luna C18, con 4.05 min y Zorbax C8 con 4.32 min. Con respecto a la respuesta de área, el mejor resultado fue para la columna ODS-3, con un valor de 6353420, posteriormente la columna Zorbax C18 con un valor de área de 6228669 y la columna Zorbax C8 con 5962591. Las columnas con menor factor de coe fueron Zorbax C18 con 1.00, ODS-3 con 1.16 y Symmetry C18 con 1.23. Por otro lado, las de menor ancho de pico fueron Symmetry C18 con 21 segundos, Luna C18 con 24 segundos y Halo C18 con 21 segundos. Con respecto al Factor de capacidad, las columnas con mejor resultado fueron Halo C18 con $K' = 2.36$ y Symmetry C18 con $K' = 4.27$.

La columna Waters® Symetry C18 fue elegida por presentar en su mayoría los mejores resultados cromatográficos en comparación con las demás columnas, otro aspecto es que presenta el menor tiempo de retención y un pico muy simétrico, bien definido y no muy ancho.

Tabla 12. Parámetros cromatográficos obtenidos de la comparación de columnas.

Columna	Flujo (mL/min)	tr (min)	Área	Coe	Ancho (seg.)	K'
Zorbax Eclipse SB C18	0.2	4.41	6228669	1.00	60.00	7.82
Phenomenex Luna C18	0.8	4.05	1711436	1.26	24.00	7.09
Inertsil ODS-3	0.2	4.27	6353420	1.16	66.00	7.54
Halo C18	0.8	4.68	112642	1.59	48.00	2.36
Waters Symmetry C18	0.8	2.63	2715729	1.23	21.00	4.27
Zorbax Eclipse XDB C8	0.2	4.32	5962591	1.33	66.00	7.65









	Waters® Symetry C18 (4.6 x 75 mm, 3.5 μm)		Phenomenex® Luna C18 (150 x 4.6 mm, 5 μm)		Inertsil® ODS C18 (33 x 46 mm, 3 μm)
	Zorbax Eclipse XDB C8 (4.6 x 50 mm, 1.8 μm)		Halo® C18 (3.0 x 75 mm, 2.7 μm)		Zorbax Eclipse SB C18 (4.6 x 50 mm, 1.8 μm)

Figura 27. Comparación de cromatogramas de t-RSV en las columnas evaluadas.

6.1.3. Selección del volumen de inyección

Los resultados de la prueba de linealidad del volumen de inyección (Tabla 13) mostraron que el rango de volumen de inyección de 2.5 a 30 μL en función del área de t-RSV, tienen una respuesta directamente proporcional y se ajustan al modelo de la línea recta, por lo tanto, se considera que presentan linealidad. El Grafico 1 muestra el comportamiento de la respuesta analítica de t-RSV con su respectiva ecuación, la cual sigue el modelo de la línea recta.

Tabla 13. Resultados de la linealidad del volumen de inyección.

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
r	Mayor a 0.998	0.9997
r²	Mayor a 0.995	0.9994
C.V.	Menor a 2.0%	0.83%
I.C. (b₀)	Incluye a 0	-38903.87 a 80403.41

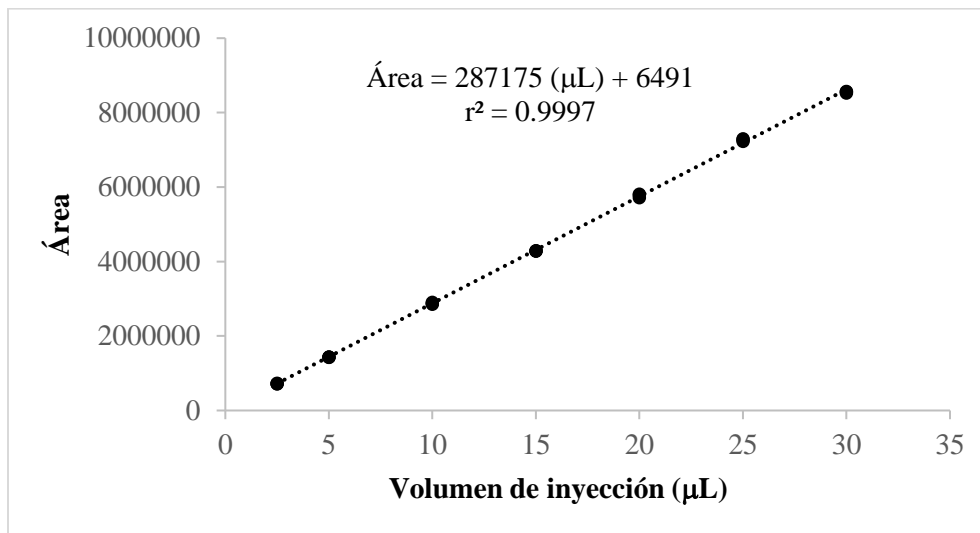


Gráfico 1. Linealidad del volumen de inyección.

Para la aceptación de esta prueba se consideró que el coeficiente de correlación sea mayor a 0.985 y el coeficiente de determinación mayor a 0.995, los cuales se cumplen y se muestran en la Tabla 13. También se muestra la determinación del intervalo de confianza, para precisar que la ordenada al origen comprende el cero.

En la Tabla 14 se muestra el análisis de varianza con un nivel de significancia del 5% en la cual se evaluó la linealidad del volumen de inyección en función del área de t-RSV mediante la comparación de los valores de F_{cal} contra el valor crítico de F , la cual determina que el valor crítico se cumple. Para ello se plantearon las siguientes hipótesis:

H₀: No existe comportamiento lineal entre el volumen de inyección y la respuesta analítica obtenida, área de t-RSV.

H₁: Existe una relación lineal entre el volumen de inyección y la respuesta analítica obtenida, área de t-RSV.

Criterio de aceptación: Si F_{cal} es menor a $F_{crítica}$ se acepta H_0 y se rechaza H_1 . Si F_{cal} es mayor a $F_{crítica}$ se rechaza H_0 y se acepta H_1 .



Como se observa en la Tabla 14, el valor de F calculada es mayor a F crítica, por lo cual se establece que existe un comportamiento lineal entre el volumen de inyección, en un rango de 2.5 a 30 μL y la respuesta analítica obtenida, área de t-RSV, por lo tanto, se rechaza H_0 .

Tabla 14. Análisis de varianza para determinar la linealidad del volumen de inyección.

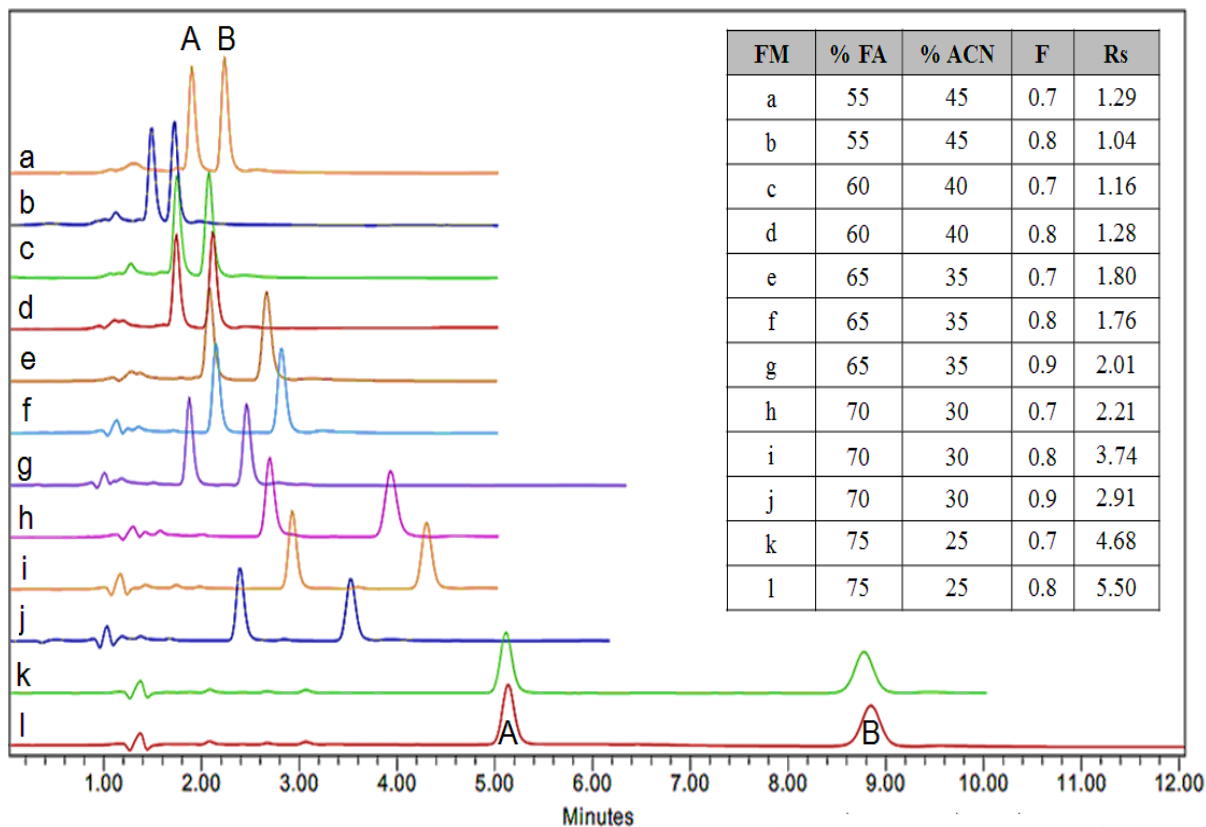
	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F calculada</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	1.56E+14	1.56E+14	62954.17	6.50E-35
Residuos	19	47068475355	2477288177		
Total	20	1.56E+14			

Como se demostró la linealidad del volumen de inyección en función del área de t-RSV, se determinó que no existe influencia o alteración en la respuesta analítica por el volumen de inyección utilizado en un rango de 2.5 a 30 μL , por lo cual se puede utilizar cualquier volumen.

6.1.4. Selección de la proporción de la fase móvil y velocidad de flujo de inyección

En la Figura 28 se muestra una comparación de los diferentes cromatogramas obtenidos con las diferentes proporciones de fase móvil y flujo de inyección utilizada. Las condiciones que presentaron mejor resolución fueron 70% de Formiato de amonio 10 mM pH=4 y 30% Acetonitrilo a un flujo de 0.9 mL/min, con un valor de 2.91

Las condiciones cromatográficas finales del desarrollo del método son con columna Waters® Symetry C18 (4.6 x 75 mm, 3.5 μm , Irlanda), a temperatura ambiente, con fase móvil de Formiato de amonio 10 mM, pH=4: Acetonitrilo (70:30), a un flujo de 0.9 mL/min, con un volumen de inyección de 10 μL de la muestra y detección a 307 nm de longitud de onda.



FM- Fase móvil; %FA-Porcentaje de Formiato de amonio; % ACN= Porcentaje de Acetonitrilo
Rs-Resolución; F-Velocidad de flujo (mL/min); A-t-RSV; B-c-RSV

Figura 28. Comparación de cromatogramas de t-RSV para la elección de la fase móvil y flujo.

Para lograr una buena resolución (Rs) entre t-RSV (A) y c-RSV (B) se usaron diferentes proporciones de fase móvil compuesta por Formiato de amonio 10 mM pH=4 (%FA) y Acetonitrilo (%ACN) con variación en la velocidad de flujo (mL/min) (F).



6.2. Validación del método analítico

6.2.1. Adecuabilidad

Se preparó una solución estándar de resveratrol al 100% y se midió la respuesta por sextuplicado, con lo cual se demuestra que los parámetros evaluados cumplen con los criterios de aceptación (Tabla 15), puesto que el factor de capacidad es mayor a 2, lo que indica que el resveratrol es retenido dentro de la columna y se encuentra alejada del tiempo muerto; el factor de coileo menor a 2, indicando que el pico del analito se encuentra dentro de la simetría normal. El número de platos teóricos que indico la eficiencia de la columna para lograr la buena separación fue de 449.23. En cuanto a la respuesta del tiempo de retención y área presentan reproducibilidad, ya que ambos tienen coeficientes de variación menor a 2.0%.

Tabla 15. Resultados para evaluar la adecuabilidad del sistema.

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
<i>Factor de coileo</i>	$T < 2.00$	1.22
<i>Factor de capacidad</i>	$K' > 2.00$	4.30
<i>Tiempo de retención</i>	tr con CV < 2%	0.54%
<i>Numero de platos</i>	-	449.23
<i>Área</i>	Área con CV < 2%	0.23%

6.2.2. Rango

Para la evaluación se utilizaron 7 concentraciones por triplicado de 0.125 a 64 $\mu\text{g/mL}$ de soluciones estándares de resveratrol, para las cuales se determinó que el rango comprende el análisis para contenido químico sea lineal, como se observa en la Grafica 2 en la cual se observa el comportamiento de respuesta. En la Tabla 16 se muestran los parámetros evaluados, los cuales se encuentran dentro de los criterios de aceptación.

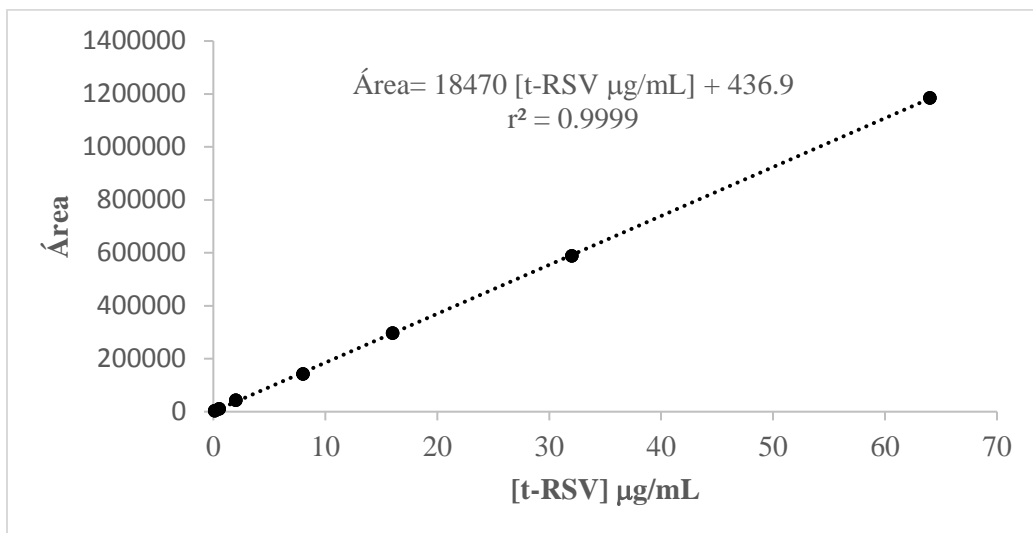


Gráfico 2. Rango de t-RSV.

Tabla 16. Resultados para evaluar el rango.

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
r	Mayor a 0.998	0.9999
r ²	Mayor a 0.995	0.9999
C.V.	Menor a 2%	1.38%
I.C. (b ₀)	Incluye a 0	-1702.95 a 2615.45

En la Tabla 17 se muestra el análisis de varianza con un nivel de significancia del 5% en la cual se evaluó la linealidad de la concentración en función del área de t-RSV mediante la comparación de los valores de F_{cal} contra el valor crítico de F, la cual determina que el valor crítico se cumple. Para ello se plantearon las siguientes hipótesis:

H₀: No existe comportamiento lineal entre la concentración y el área de t-RSV.

H₁: Existe una relación lineal entre la concentración y el área de t-RSV.

Criterio de aceptación: Si F_{cal} es menor a $F_{crítica}$ se acepta H_0 y se rechaza H_1 . Si F_{cal} es mayor a $F_{crítica}$ se rechaza H_0 y se acepta H_1 .



Tabla 17. Análisis de varianza para determinar la linealidad del rango.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	Valor crítico de F
Regresión	1	3.37E+12	3.37E+12	249305.6691	1.37E-40
Residuos	19	2.57E+08	1.35E+07		
Total	20	3.37E+12			

Como se observa en la Tabla 17, el valor de F calculada es mayor a F crítica, por lo cual se establece que existe un comportamiento lineal entre la concentración, en un rango de 0.125 a 64 µg/mL de t-RSV y la respuesta analítica obtenida, por lo tanto, se rechaza H₀.

6.2.3. Linealidad del sistema

La linealidad del sistema demuestra la relación de la concentración de resveratrol en función de la respuesta analítica, la cual se evaluó mediante 6 niveles de concentraciones de resveratrol en un rango de 0.525-16.8 µg/mL por triplicado y se encuentra representada en la Gráfica 3, en donde se observa que su comportamiento sigue el modelo lineal. Por otro lado, los parámetros evaluados se encuentran en la Tabla 18 y se encuentran dentro de los criterios de aceptación.

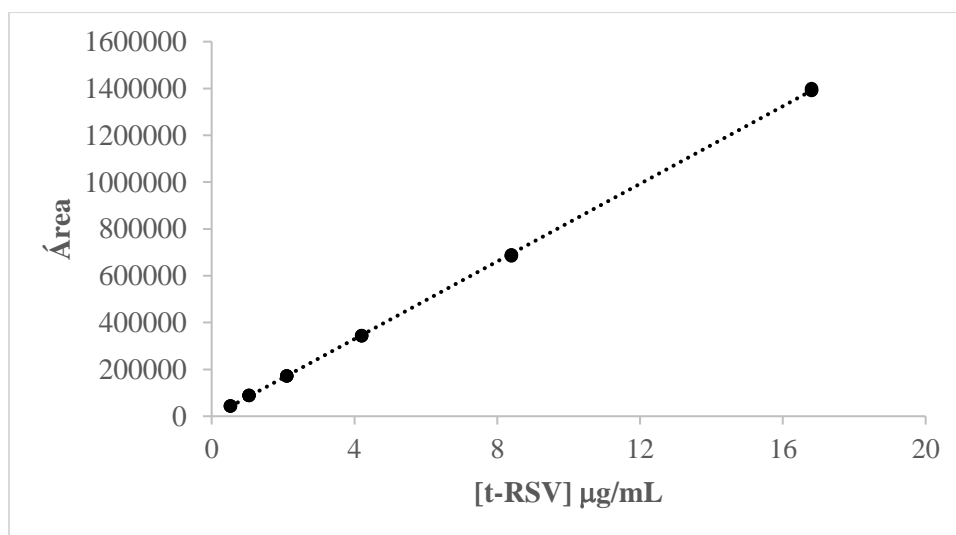


Gráfico 3. Linealidad del sistema de t-RSV.



Tabla 18. Resultados para evaluar la linealidad del sistema.

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
r	Mayor a 0.998	0.9999
r ²	Mayor a 0.995	0.9999
C.V.	Menor a 2%	1.391%
I.C. (b ₀)	Incluye a 0	-4729.09 a 1448.42
I.C. (b ₁)	No incluye a 0	82477.02 a 83257.14

Para evaluar la linealidad de la concentración en función del área se realizó análisis de varianza con un nivel de significancia del 5% (Tabla 19) la cual se evaluó mediante la comparación de los valores de F_{cal} contra el valor crítico de F , la cual determina que el valor crítico se cumple. Para ello se plantearon las siguientes hipótesis:

H₀: No existe comportamiento lineal entre la concentración y el área.

H₁: Existe una relación lineal entre la concentración y el área.

Criterio de aceptación: Si F_{cal} es menor a $F_{crítica}$ se acepta H_0 y se rechaza H_1 . Si F_{cal} es mayor a $F_{crítica}$ se rechaza H_0 y se acepta H_1 .

Tabla 19. Análisis de varianza para determinar la linealidad del sistema.

	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Promedio de los cuadrados	F calculada	Valor crítico de F
Regresión	1	3.99E+12	3.99E+12	202829.23	2.94E-34
Residuos	16	315106589	19694162		
Total	17	3.99E+12			

Como se observa en la Tabla 19, el valor de F calculada es mayor a F crítica, por lo cual se establece que existe un comportamiento lineal entre la concentración, en un rango de 0.525 a 16.8 $\mu\text{g/mL}$ de t-RSV y la respuesta analítica obtenida, por lo tanto, se rechaza H_0 .



6.2.4. Selectividad

En la Figura 29 se pueden observar los cromatogramas obtenidos de las diferentes muestras control analizadas, y en la Figura 30 se observan los cromatogramas de las muestras sometidas a degradación forzada en las cuales se puede observar que en el tiempo de retención del analito no hay señales adicionales, por lo cual se determina que no existe interferencia en la cuantificación de este mismo y que la señal solo es debida al analito.

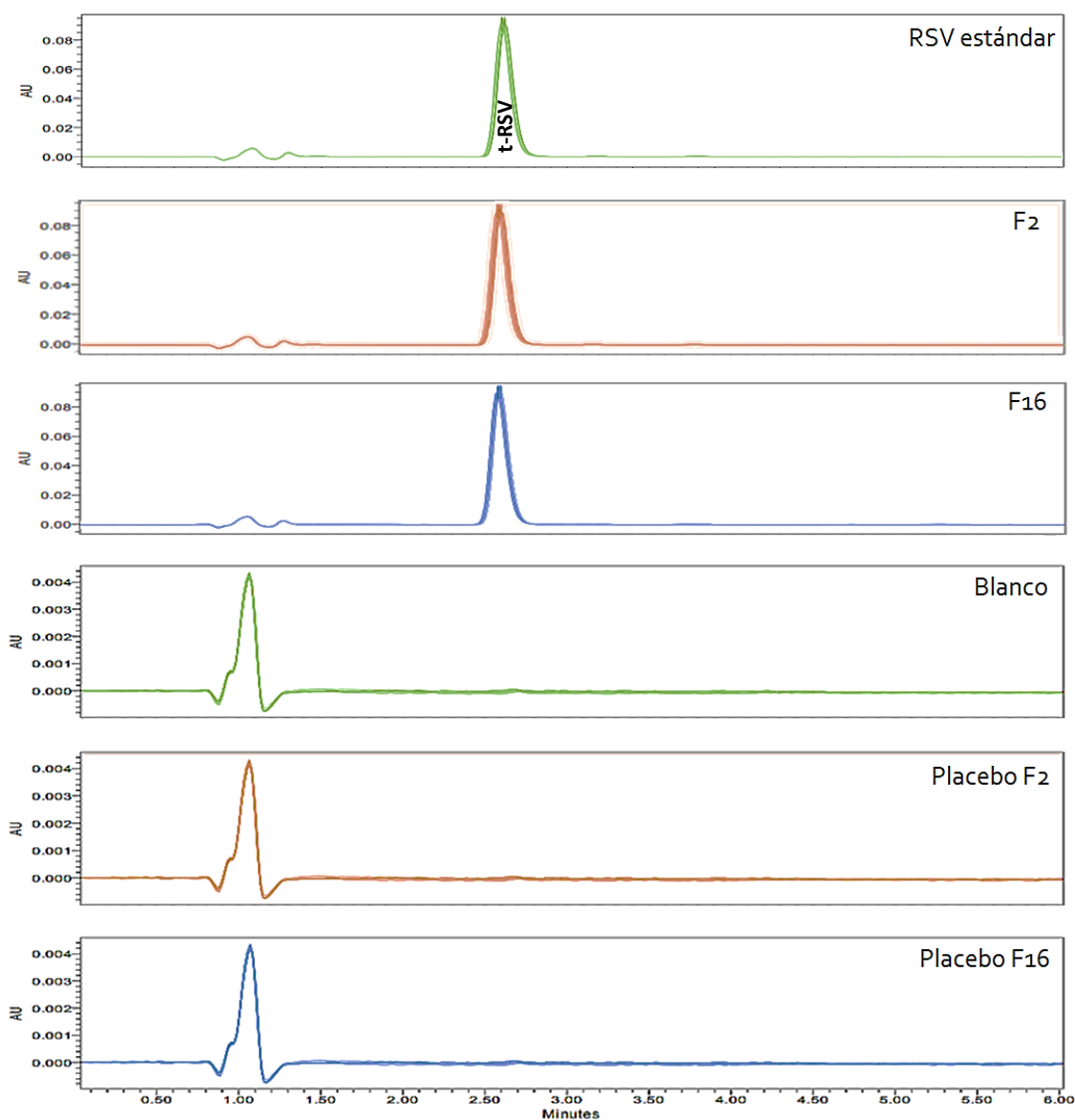


Figura 29. Cromatogramas de muestras control para la determinación de selectividad.

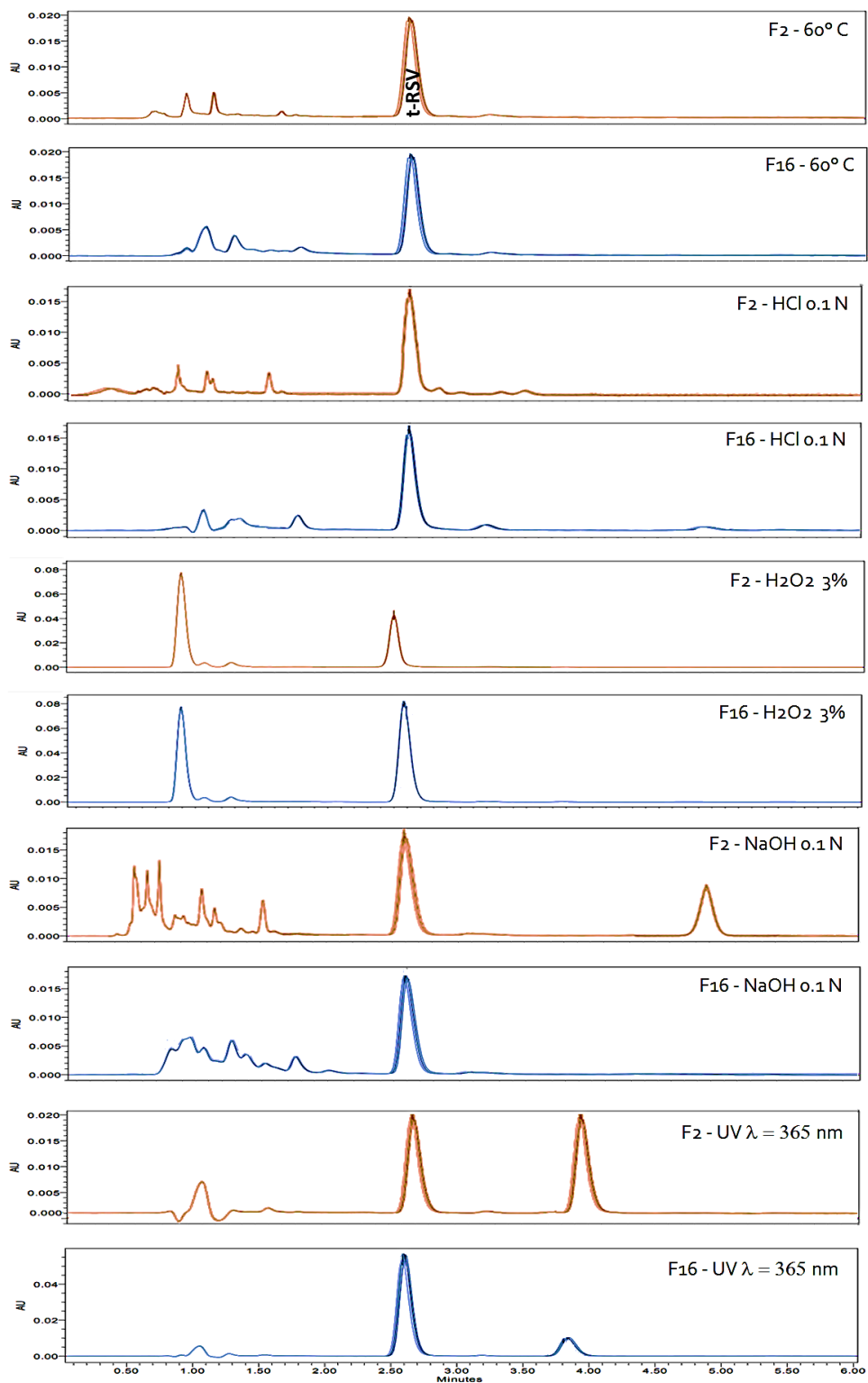


Figura 30. Cromatogramas de degradación forzada por 24 horas para la determinación de selectividad.



6.2.5. Precisión y exactitud

La precisión del método determina el grado de concordancia entre los resultados obtenidos, mientras que la exactitud evalúa la proximidad de los estos mismos en relación con el valor de referencia, los cuales son evaluados mediante el coeficiente de variación y el porcentaje de recobro. Para evaluar ambos parámetros se preparó una curva de calibración compuesta por 3 niveles de concentración al 80, 100 y 120% por sextuplicado, la cual está representada en el Gráfico 4 con el comportamiento de la concentración adicionada en función de la concentración estimada de resveratrol. En la Tabla 20, se muestran los parámetros evaluados los cuales se encuentran dentro de los criterios de aceptación, lo cual garantiza que no existe diferencia significativa entre el sistema de muestras evaluadas, dando por entendido que el método es exacto y preciso.

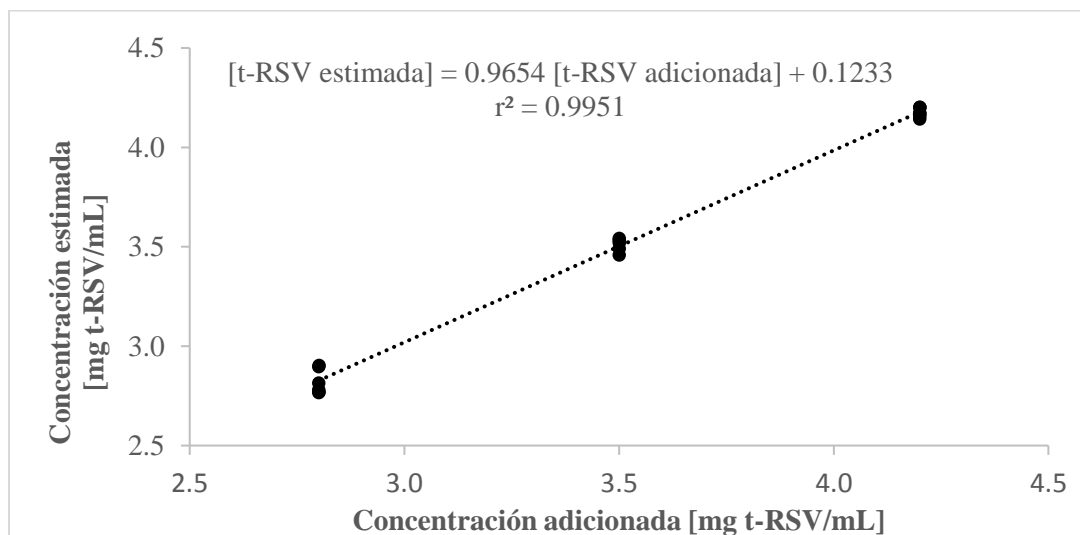


Gráfico 4. Exactitud y precisión de t-RSV.

Tabla 20. Resultados para evaluar la precisión y exactitud.

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
% de recuperación	98-102%	100.16
C.V.	Menor a 2%	1.47%
I.C. (b1)	Incluya el 1	0.93 a 1.00



6.2.6. Linealidad del método

Para evaluar que el método es lineal se evaluaron 5 niveles de concentración en un intervalo por triplicado del 80 al 100% de concentración de placebos cargados de resveratrol. Esta prueba determina la capacidad del método para dar respuestas independientes de la cantidad en la que se encuentre el analito con respecto a los componentes de la matriz.

En la Tabla 21 se encuentran los resultados de los parámetros evaluados los cuales se encuentran dentro de los criterios de aceptación y en el Grafico 5 se observa la tendencia lineal de los datos obtenidos entre la concentración adicionada y la concentración estimada.

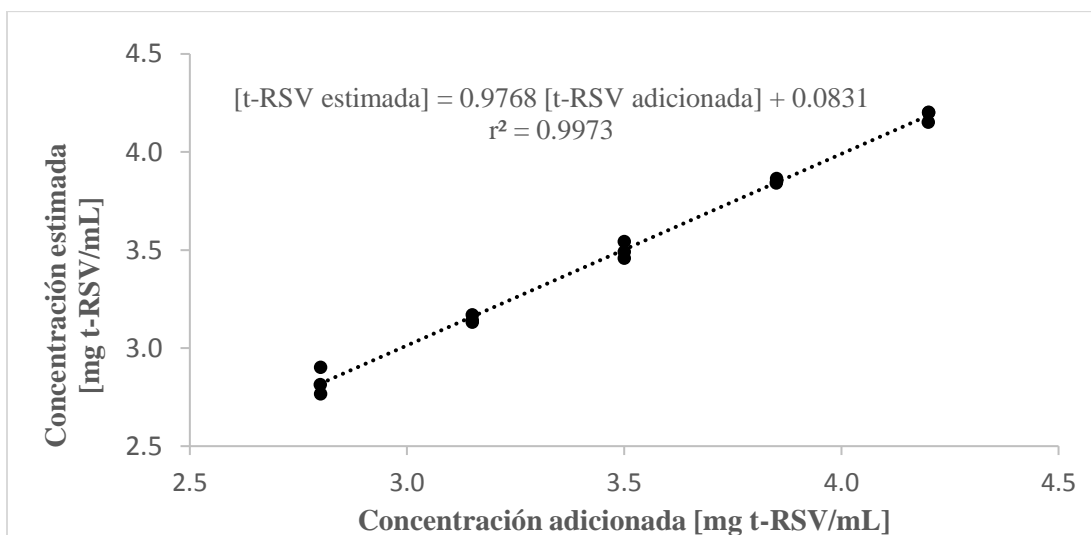


Gráfico 5. Linealidad del método de t-RSV

Tabla 21. Resultados para evaluar la linealidad del método.

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
% de recuperación	98.0 a 102.0%	100.11
r	Mayor a 0.998	0.999
r ²	Mayor a 0.995	0.997
C.V.	Menor a 2%	1.19%
I.C. (b ₀)	Incluye a 0	-0.06 a 0.23
I.C. (b ₁)	Incluye a 1	0.94 a 1.02



En el Gráfico 6 se observa el comportamiento de los residuales de la cantidad adicionada de RSV en donde se demuestra la homocedasticidad de los datos obtenidos, que demuestra que la varianza de los residuos es constante y no varía en diferentes niveles del analito. De esa forma se evidencia que las estimaciones son eficientes dado que el error de las mediciones es aleatorio.

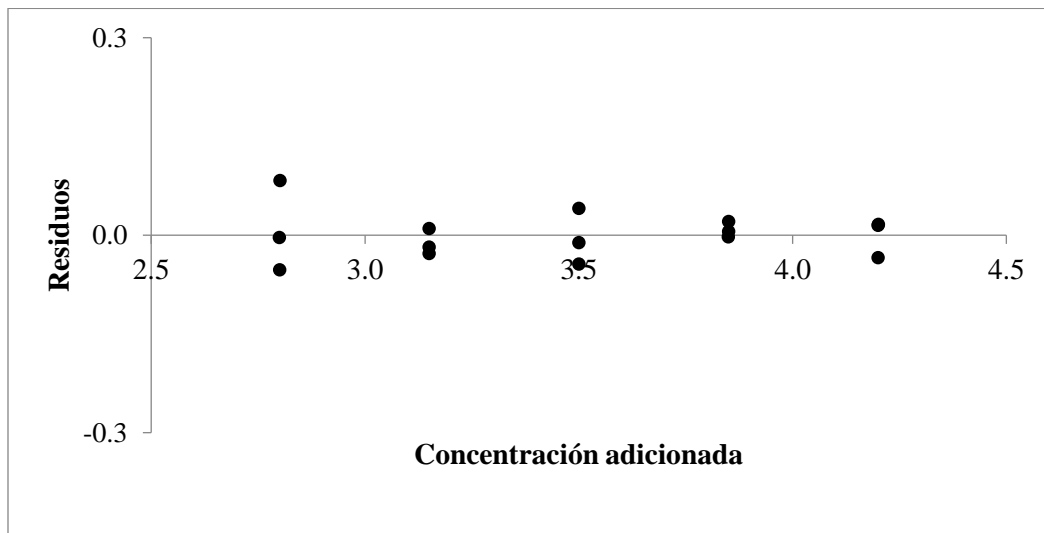


Gráfico 6. Residuales obtenidos de la linealidad del método.

En la Tabla 22 se encuentra el análisis de varianza con un nivel de significancia del 5% para la evaluación de la linealidad de la concentración adicionada en función de la concentración estimada de resveratrol, la cual se evaluó por la comparación de los valores de F calculada contra el valor crítico de F, la cual determina que el valor crítico se cumple.

Para ello se plantearon las siguientes hipótesis:

H₀: No existe comportamiento lineal entre la concentración adicionada y la estimada.

H₁: Existe una relación lineal entre la concentración adicionada y la estimada.

Criterio de aceptación: Si F_{cal} es menor a $F_{crítica}$ se acepta H_0 y se rechaza H_1 . Si F_{cal} es mayor a $F_{crítica}$ se rechaza H_0 y se acepta H_1 .



Tabla 22. Análisis de varianza para determinar la linealidad del método.

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F calculada</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	3.51	3.51	2730.51	1.69E-16
Residuos	13	0.02	0.00		
Total	14	3.52			

Como se observa en la Tabla 22, el valor de F calculada es mayor a F crítica por lo cual se establece que existe un comportamiento lineal entre la concentración adicionada y la concentración estimada de resveratrol en un rango de 80 a 120%, aun considerando los niveles de la matriz, por lo tanto, se rechaza la hipótesis nula.

6.2.7. Repetibilidad y Reproducibilidad

A través de la evaluación de la repetibilidad y la reproducibilidad se verifica la concordancia entre los resultados de un mismo laboratorio, obtenidos en diferentes días, con diferentes analistas. Para su análisis se determinó por sextuplicado un placebo cargado de resveratrol al 100% de la concentración del analito en dos días diferentes por dos analistas diferentes.

En la Tabla 23 se observan los resultados promedio entre analistas y días en donde el porcentaje de recobro se encuentra dentro del 98 a 102% y el coeficiente de variación es menor a 2, por lo tanto, la cuantificación de resveratrol es reproducibles y repetible.

Tabla 23. Resultados para evaluar la repetibilidad y reproducibilidad.

Parámetro	Recuperación (%)	CV (%)
Criterio de aceptación	98.0 a 102.0	Menor a 2
Resultado Analista 1 día 1	100.05	0.39
Resultado Analista 1 día 2	99.64	0.41
Resultado Analista 2 día 1	99.85	0.40
Resultado Analista 2 día 2	99.74	0.19
Resultado global	99.74	0.40



En el Grafico 7, se encuentra un análisis estadístico de modelo generalizado con un intervalo del 95% de confianza de la influencia de los factores, en donde se observa que no existe diferencia significativa entre analistas o días.

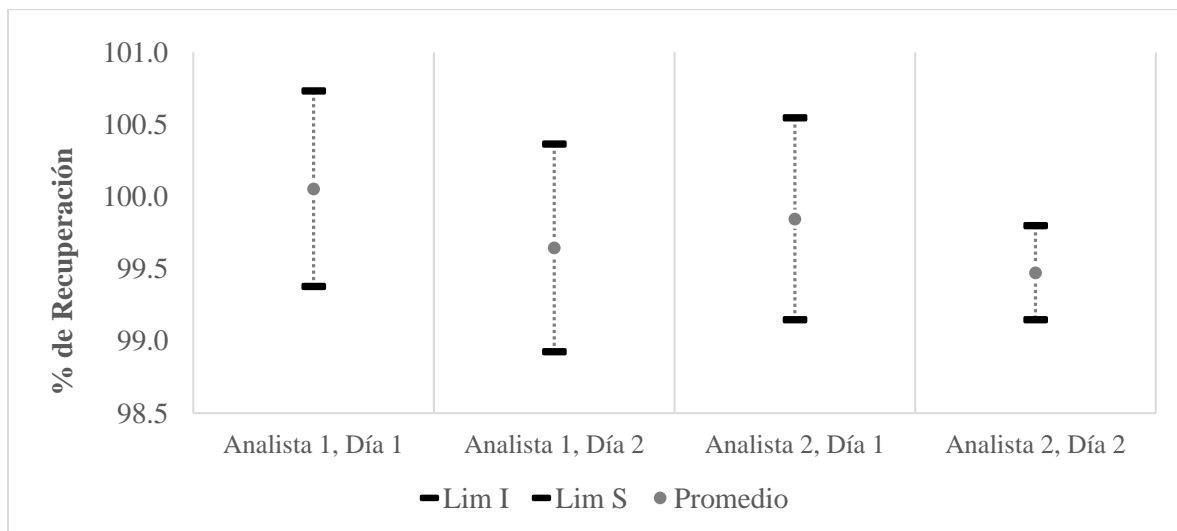


Gráfico 7. Reproducibilidad y repetibilidad entre días y analistas.

6.2.8. Límite de detección y cuantificación

Para su determinación se utilizaron los parámetros obtenidos (Tabla 24) de la curva de calibración del sistema, mediante las fórmulas mencionadas anteriormente.

Tabla 24. Parámetros de la curva de calibración del sistema.

Parámetro	Valor obtenido
r	0.9999
r²	0.9999
Ordenada al origen (b₀)	82867.08
Pendiente (b₁)	-1640.33
Desviación estándar del intercepto (s_{b0})	1457.02
Desviación estándar de la regresión (S_{y/x})	3678.42



Tabla 25. Cálculo del límite de detección y cuantificación.

Método	Límite de cuantificación	Límite de detección
Desviación estándar de la regresión ($S_{y/x}/b_1$)	$\frac{10 \times 3678.4212}{82867.0805}$ $= 0.444 \mu\text{g}/\text{mL}$	$\frac{3.3 \times 3678.4212}{82867.0805}$ $= 0.146 \mu\text{g}/\text{mL}$
Desviación estándar del intercepto (s_{b_0}/b_1)	$\frac{10 \times 1457.0242}{82867.0805}$ $= 0.176 \mu\text{g}/\text{mL}$	$\frac{3.3 \times 1457.0242}{82867.0805}$ $= 0.058 \mu\text{g}/\text{mL}$

Los valores teóricos obtenidos para LC y LD se muestran en la Tabla 25, teniendo que por el método de desviación estándar de la regresión para LC su valor fue de 0.444 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RSV, mientras que para LD fue de 0.146 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RSV. Por otro lado, por el método de desviación estándar del intercepto el valor de LC es igual a 0.176 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RSV y el de LD fue de 0.058 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RSV.

6.2.9. Robustez

La robustez mide la capacidad del método para permanecer inalterado por pequeñas variaciones experimentales. Para evaluar la robustez se establecieron 5 variables y se realizó una diferencia absoluta de medias entre la condición normal y las condiciones alteradas, la cual es menor a 2, para demostrar que el cambio de condiciones no afecta significativamente los recobros obtenidos durante el análisis. En la Tabla 26 se observan los promedios de los valores de recuperación obtenidos, el coeficiente de variación y la diferencia absoluta, para cada factor evaluado, en donde se puede observar que las condiciones evaluadas de volumen de inyección (10, 9 y 11 μL), pH de la fase móvil de Formiato de amonio 10 mM (pH=4, 3 y 5), proporción de la fase móvil FA:ACN (70:30, 69:31 y 71:29), el número de serie de la columna y el cambio de sistema cromatográfico de HPLC a UPLC no afectan los porcentajes de recuperación de la muestra. En el Grafico 8, se encuentra un análisis estadístico de modelo generalizado con un intervalo del 95% de confianza de la influencia de los factores, en donde se observa que no existe diferencia significativa entre los factores evaluados y sus modificaciones.



Tabla 26. Resultados de los factores evaluados para la robustez.

Factor	Nivel	Alteración	Recobro (%)	CV (%)	$ d_i < 2.0$
Volumen de inyección	Bajo	9 μ L	100.01	0.1613	0.18
	Normal	10 μ L	100.19	0.4898	
	Alto	11 μ L	99.96	0.0689	0.24
Fase móvil	Bajo	FA: ACN (69:31)	100.36	0.5073	0.32
	Normal	FA: ACN (70:30)	100.04	0.8867	
	Alto	FA: ACN (71:29)	99.89	0.3844	0.16
pH de Fase móvil FA	Bajo	pH=3	100.00	0.8078	0.00
	Normal	pH=4	100.00	0.4560	
	Alto	pH=5	100.00	0.3491	0.00
No. De serie de la columna	Bajo	W22121V 041	100.00	1.1677	0.00
	Normal	W23331X 020	100.00	1.1178	
	Alto	W32581T 016	100.00	0.8080	0.00
Equipo	Bajo	UPLC	100.01	0.2345	0.01
	Normal	HPLC	100.00	0.3091	

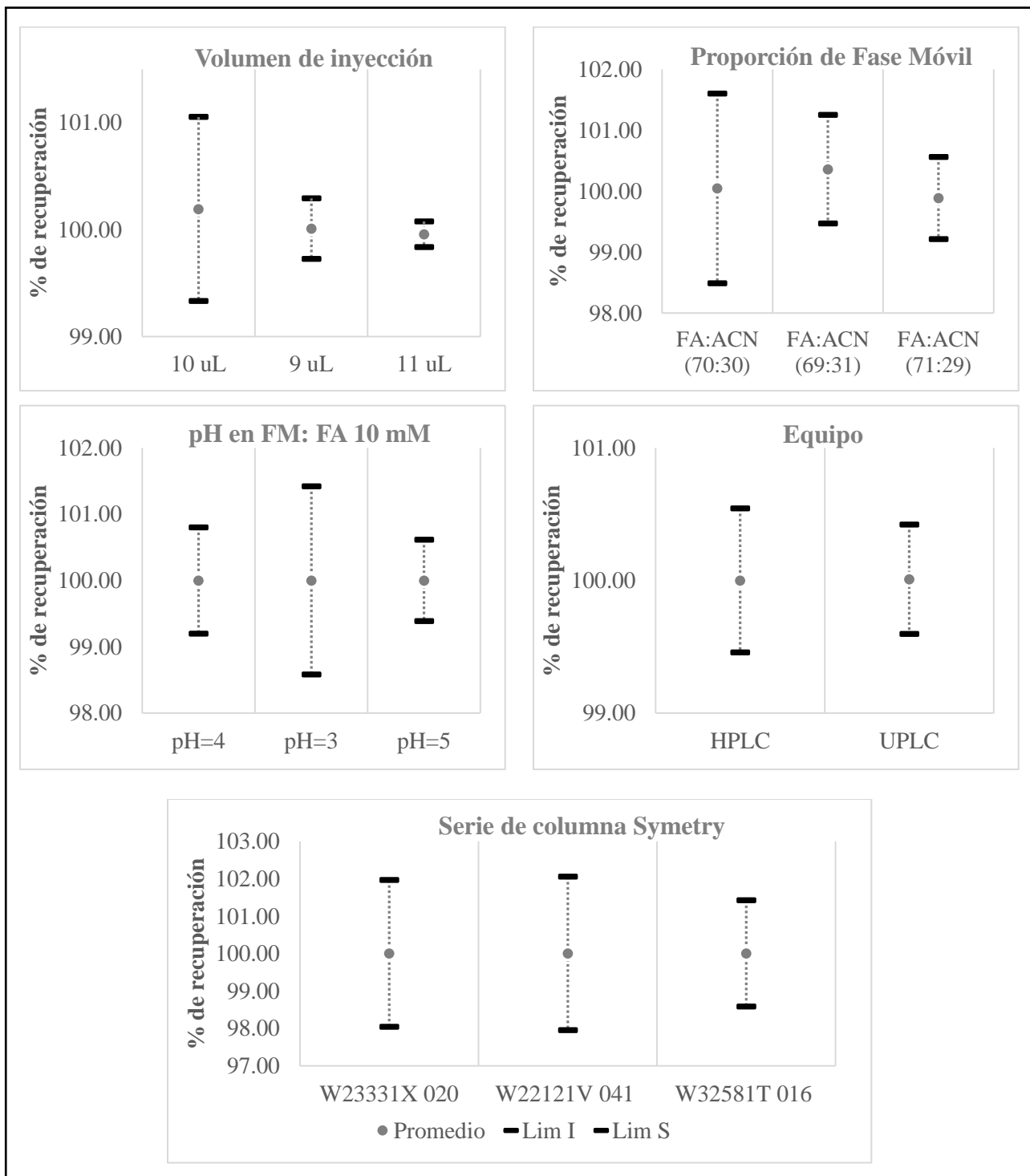


Gráfico 8. Comparación de factores modificados para robustez del método.



Tabla 27. Resumen de resultados de los parámetros evaluados para la validación del método analítico indicativo de estabilidad de trans-resveratrol en una formulación parenteral.

Parámetro	Niveles	Especificaciones	Resultados	Conclusiones
Adecuabilidad	Estándar equivalente al 100% por quintuplicado	Área CV < 2% tr CV < 2% k' > 2 T < 2 N	Área CV = 0.23% tr CV = 0.54% k' = 4.30 T = 1.21 N = 449.23	Conforme
Rango	Estándares 7 niveles de concentración por triplicado	r > 0.998 r ² > 0.995 IC (b ₀) Incluye 0	r = 0.9999 r ² = 0.9999 IC (b ₀): -702.95 a 3615.45	Conforme
Linealidad del sistema	Estándares 6 niveles de concentración por triplicado	r > 0.998 r ² > 0.995 CV < 2% IC (b ₀) Incluye 0 IC (b ₁) No incluye a 0	r = 0.9999 r ² = 0.9999 CV = 1.39% IC (b ₀): -4729.09 a 1448.49 IC (b ₁): 82477.02 a 83257.19	Conforme
Especificidad	Blanco, estándares, placebo adicionado y muestras con condiciones estresantes por sextuplicado	No debe de existir respuesta analítica al tiempo de retención del analito.	No hay respuesta analítica	Conforme
Exactitud y repetibilidad	Placebo adicionado 3 niveles de concentración por sextuplicado	% recuperación de 98.0-102% % de recuperación CV < 2% IC (b ₁) Incluye a 1	% recuperación = 100.16 CV = 1.47% IC (b ₁): 0.93 a 1.00	Conforme



Tabla 27. Resumen de resultados de los parámetros evaluados para la validación del método analítico indicativo de estabilidad de trans-resveratrol en una formulación parenteral (Continuación).

Parámetro	Niveles	Especificaciones	Resultados	Conclusiones
Linealidad del método	Placebo adicionado 5 niveles de concentración por triplicado	$r > 0.998$ $r^2 > 0.995$ % recuperación de 98.0-102% % de recuperación CV < 2% IC (b ₀) Incluye 0 IC (b ₁) Incluye a 1	$r = 0.9986$ $r^2 = 0.9973$ % recuperación = 100.11 CV = 1.19% IC (b ₀) = -0.06 a 0.23 IC (b ₁) = 0.94 a 1.02	Conforme
Reproducibilidad y repetibilidad	Placebo adicionado equivalente al 100% (2 días, 2 analistas) por sextuplicado	CV global < 2%	CV = 0.40%	Conforme
Límite de detección	Curva de calibración del sistema validada	-	LD _{Sy/x/b1} = 0.146 µg/mL LD _{Sb0/b1} = 0.058 µg/mL	Conforme
Límite de cuantificación	Curva de calibración del sistema validada	-	LQ _{Sy/x/b1} = 0.444 µg/mL LQ _{Sb0/b1} = 0.176 µg/mL	Conforme
Robustez	Placebo adicionado al 100% por sextuplicado para variación en volumen de inyección, fase móvil, pH de la fase móvil, número de serie de la columna y equipo	d _i con respecto a la media de % de recobro < 2 Para cada factor	Volumen de inyección: 9µL d _i =0.18 11µL d _i =0.24 Fase móvil (FA: ACN): (69:31) d _i =0.32 (71:29) d _i =0.16 pH de la fase móvil: pH=3 d _i =0 pH=5 d _i =0 No. de serie de la columna: Para ambas columnas d _i =0 Equipo: UPLC d _i =0.01	Conforme



6.3. Ensayo de estabilidad

Para el método indicativo de estabilidad se prepararon diluciones por triplicado de *trans*-resveratrol estándar, Formulación 2 y Formulación 16 a una concentración de 4.2 µg/mL, (100% del analito) y fueron sometidos a condiciones de estrés durante 5 días para su degradación forzada de Hidrólisis, oxidativas, fotolíticas y de calor. Se realizaron análisis de estas mismas a las 24 (1 día), 72 (3 días) y a las 120 horas (5 días), mediante el método analítico desarrollado y validado anteriormente.

6.3.1. Degradación forzada de resveratrol por hidrólisis

Los porcentajes de recuperación obtenidos en el ensayo de hidrólisis de resveratrol estándar, formulación 2 y formulación 16 se muestran en la Tabla 28, en donde se puede observar que resveratrol estándar tiene una mejor estabilidad en comparación con las muestras de formulaciones 16 y 2, puesto que hubo mayor porcentaje de recuperación en las condiciones evaluadas. Con los datos obtenidos se realizó una comparación de las líneas de regresión para cada analito evaluado del logaritmo del porcentaje de recuperación en función de horas.

En la Figura 31 se encuentran los cromatogramas obtenidos de los grupos HCl 0.1 N Control y NaOH 0.1 N Control por cada temperatura y día de medición, en donde se puede observar que los medios de disolución utilizados en el estudio de hidrólisis ácida y básica no causaron picos de respuesta que propiciarán interferencia en la medición de la respuesta del t-RSV.

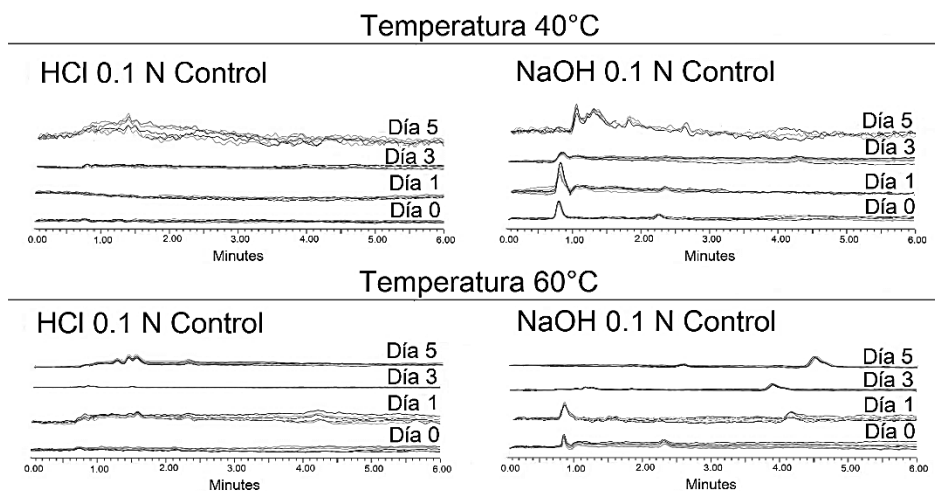


Figura 31. Comparación de cromatogramas de HCl 0.1 N Control y NaOH 0.1 N Control por día.



Tabla 28. Resultados de estabilidad en condiciones de hidrólisis.

	Temperatura	Horas	%RSV_STD	%RSV_F16	%RSV_F2
Formulación Control	40	0	100.26	99.97	99.82
		24	94.83	96.54	95.10
		72	87.76	83.27	88.01
		120	71.40	65.33	76.82
	60	0	99.06	100.18	99.82
		24	93.31	43.18	90.54
		72	84.97	21.73	49.40
		120	67.96	7.59	4.83
HCl 0.1 N	40	0	95.46	99.91	99.82
		24	91.91	36.58	23.00
		72	90.62	0	13.51
		120	88.06	0	12.89
	60	0	95.97	99.66	99.82
		24	92.18	79.13	91.13
		72	87.97	61.08	42.05
		120	81.06	52.53	12.03
NaOH 0.1 N	40	0	96.58	98.90	99.82
		24	33.25	41.39	19.44
		72	4.41	0	0
		120	0	0	0
	60	0	96.59	99.51	99.82
		24	5.48	0	1.30
		72	0	0	0
		120	0	0	0



Para el grupo de Formulación control, en el cual solo tenía el analito en concentración de 4.2 µg/mL de t-RSV en etanol: agua (50:50) y fue sometido a 40 y 60 ° C durante 5 días, se obtuvieron los esquemas de regresión lineal que se encuentran en el Gráfico 9, en donde se observa que la muestra de estándar tuvo un mayor decrecimiento de concentración a temperatura de 40°C, a comparación de la formulación 16 y formulación 2, las cuales tienen un comportamiento parecido, mientras que a temperatura de 60°C la formulación 16, fue la más inestable, seguido de la muestra formulación 2 y el estándar.

Con los datos de las pendientes correspondientes a cada analito y a cada condición (Tabla 29), se realizó la aplicación de la ecuación de Arrhenius (Gráfico 10), con el cual se predijo que para resveratrol estándar el tiempo en el cual el activo se degrada un 10% (t_{90}) en 40° C fue de 38.56 horas y en 60° C el t_{90} fue de 34.53 horas. Con respecto a las muestras de formulaciones evaluadas el t_{90} fue menor en ambas temperaturas, pero siendo de menor tiempo en 60°C; para la F16 el t_{90} en 40° fue de 29.42 horas y en 60°C es de 5.17 horas, mientras que para F2 se obtuvo en 40° C un t_{90} de 49.28 horas y en 60°C de 4.26 horas. Con esto se puede concluir que a temperatura de 40°C presenta mayor tiempo de estabilidad la muestra de la formulación 2, mientras que a 60°C es la muestra del estándar.

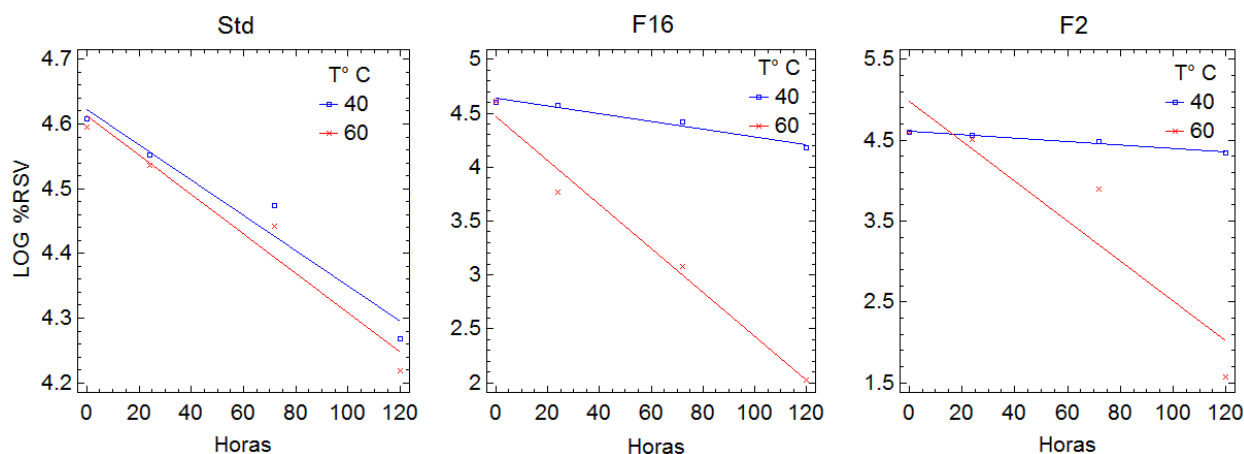


Gráfico 9. Comparación de líneas de regresión de cada analito de Formulación Control.



Tabla 29. Ecuación de Arrhenius para Formulación Control.

Analito	T °	Intercepto	Pendiente	K	Ecuación de Arrhenius	K _{estimada}	t ₉₀ (h)
Estándar	40° C	4.62	-0.00272	0.00272	$K=0.01 * e^{(0.09/(kb*(T^{\circ}C+273.15)))}$	0.002	38.56
	60° C	4.61	-0.00304	0.00304		0.003	34.53
F16	40° C	4.63	-0.00357	0.00357	$K=1.36 * 10^{10} * e^{(-0.78/(kb*(T^{\circ}C+273.15)))}$	0.004	29.42
	60° C	4.46	-0.02032	0.02032		0.020	5.17
F2	40° C	4.60	-0.00213	0.00213	$K=1.11 * 10^5 * e^{(-1.1/(kb*(T^{\circ}C+273.15)))}$	0.002	49.28
	60° C	4.97	-0.02468	0.02468		0.025	4.26

T° = Temperatura
K= Pendiente * (-1)

kb = constante de Boltzmann (8.617E-5 EV/grados K)
K_{estimada}= calculada con la ecuación de Arrhenius

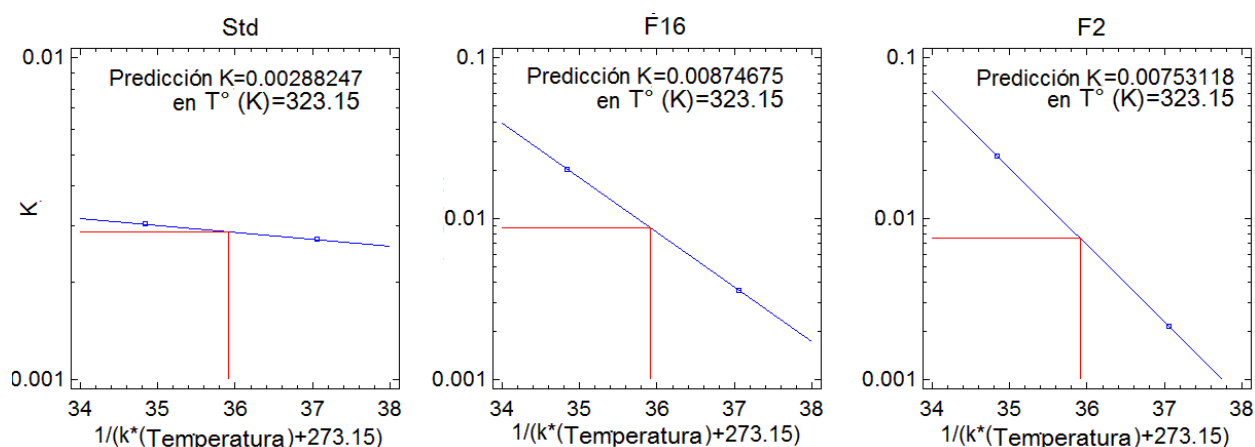


Gráfico 10. Esquemas de la Ecuación de Arrhenius para Formulación Control.

Para el grupo de HCl 0.1 N, el cual contenía el analito en concentración de 4.2 µg/mL de t-RSV diluidos con solución de ácido clorhídrico 0.1 N y fue sometido a 40° y 60 ° C durante 5 días, con el fin de que presentaran hidrólisis ácida. Los esquemas obtenidos de estas condiciones se muestran en el Gráfico 11, donde se puede observar que resveratrol estándar tiene una tendencia menor de degradación a comparación de las muestras de las formulaciones. La formulación 16 en temperatura de 40°C tuvo una mayor degradación, llegando a un 0% de recuperación desde antes de las 72 horas, a comparación de la de 60°C que la degradación fue más lenta. Por otro lado, la formulación 2 presenta mayor durabilidad a condición de hidrólisis ácida en comparación de la formulación 16, lo cual se puede deber a los excipientes que la conforman.

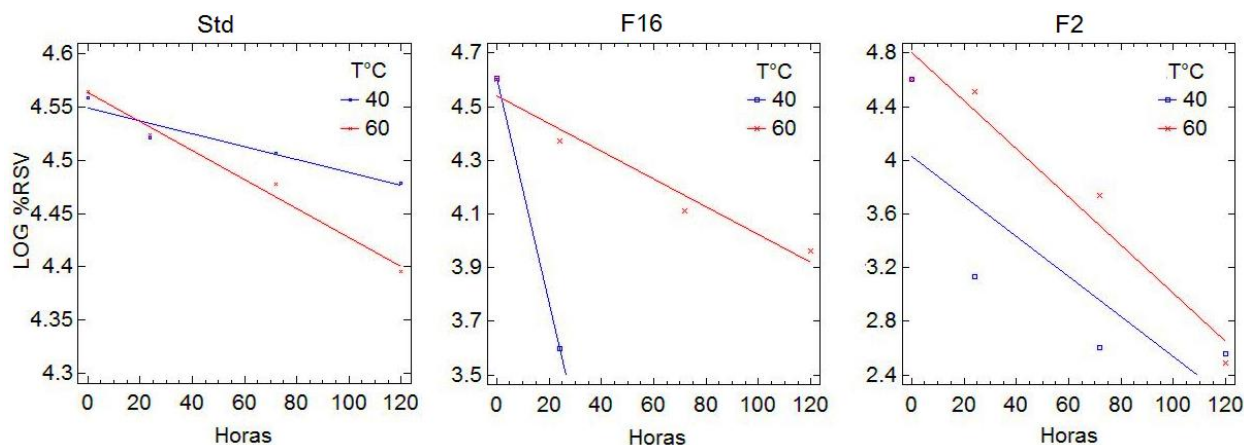


Gráfico 11. Comparación de líneas de regresión de cada analito de HCl 0.1 N.

Igualmente, con los datos las pendientes obtenidas de cada analito y condición, se realizó la aplicación de la ecuación de Arrhenius (Gráfico 12) para posteriormente calcular t_{90} . El gráfico de Arrhenius para la formulación 16 presenta una pendiente de dirección diferente, a comparación de F2 y STD, debido a que la degradación fue mayor a 40°C que a 60°C.

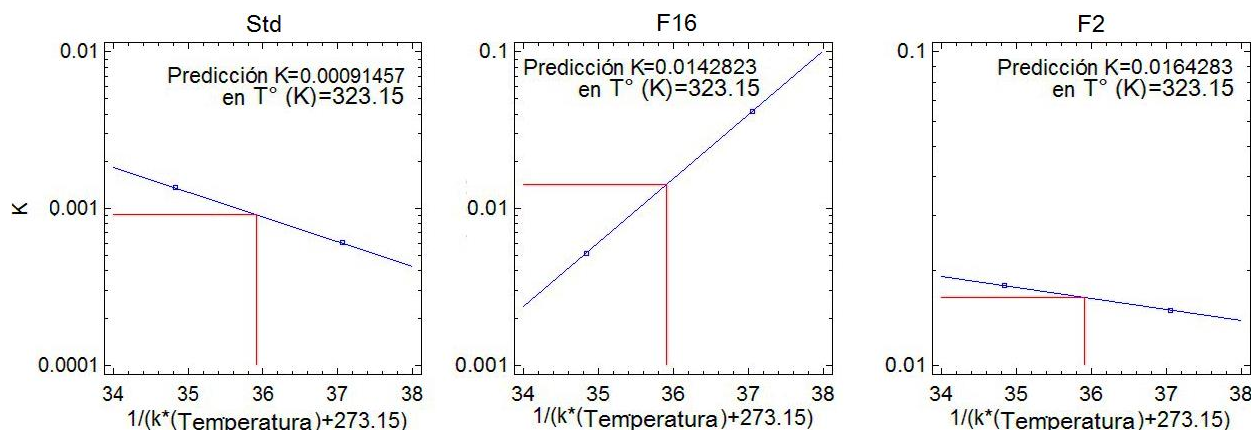


Gráfico 12. Esquemas de la Ecuación de Arrhenius para HCl 0.1 N.

En la Tabla 30 se muestra la ecuación de Arrhenius para cada muestra, con la cual se obtuvo que en condición de hidrólisis a temperatura de 40° y 60°C la muestra estándar fue la más estable a comparación de las formulaciones. El estándar tiene una t_{90} de 38.56 horas a 40°C y a 60°C 34.53 horas. La formulación 16 para 60° C tiene una t_{90} de 20.2 horas y de 2.51 horas a 40°C. En el caso de la formulación 2 se estimó un t_{90} de 7.02 y 5.86 horas para 40° y 60°C respectivamente.



Tabla 30. Ecuación de Arrhenius para HCl 0.1 N.

Analito	T °	Intercepto	Pendiente	K	Ecuación de Arrhenius	K _{estimada}	t ₉₀ (h)
Estándar	40° C	4.5486	-0.00060	0.00060	$K=0.01 * e^{(-0.05/(kb*(T^{\circ}C+273.15)))}$	0.003	38.56
	60° C	4.5631	-0.00135	0.00135		0.003	34.53
F16	40° C	4.6043	-0.0419	0.0419	$K=3.38*10^{-17} * e^{(0.94/(kb*(T^{\circ}C+273.15)))}$	0.042	2.51
	60° C	4.5423	-0.00519	0.00519		0.0052	20.20
F2	40° C	4.0323	-0.01495	0.01495	$K=0.31 * e^{(-0.09/(kb*(T^{\circ}C+273.15)))}$	0.015	7.02
	60° C	4.8046	-0.01795	0.01795		0.018	5.85

T° = Temperatura
K= Pendiente * (-1)

kb = constante de Boltzmann (8.617E-5 EV/grados K)
K_{estimada}= calculada con la ecuación de Arrhenius

En el grupo de hidrólisis NaOH 0.1 N, se hicieron diluciones de cada muestra a una concentración de 4.2 µg/mL de t-RSV, aforados con hidróxido de sodio 0.1 N, y sometidos a 40°C y 60°C, con el fin de lograr una degradación forzada de tipo hidrólisis básica.

En el Gráfico 13 se encuentran los esquemas de regresión lineal de cada analito en donde se puede notar que en condiciones de hidrólisis básica a 40° la formulación 16 presenta mejor estabilidad, mientras que Resveratrol en estándar y en formulación 2 tienden a degradarse rápidamente, antes de las 80 horas. A una temperatura de 60° C se observa que tanto resveratrol estándar, como en la formulación 16 y 2, tienen el mismo patrón de estabilidad, degradándose antes de las 40 horas.

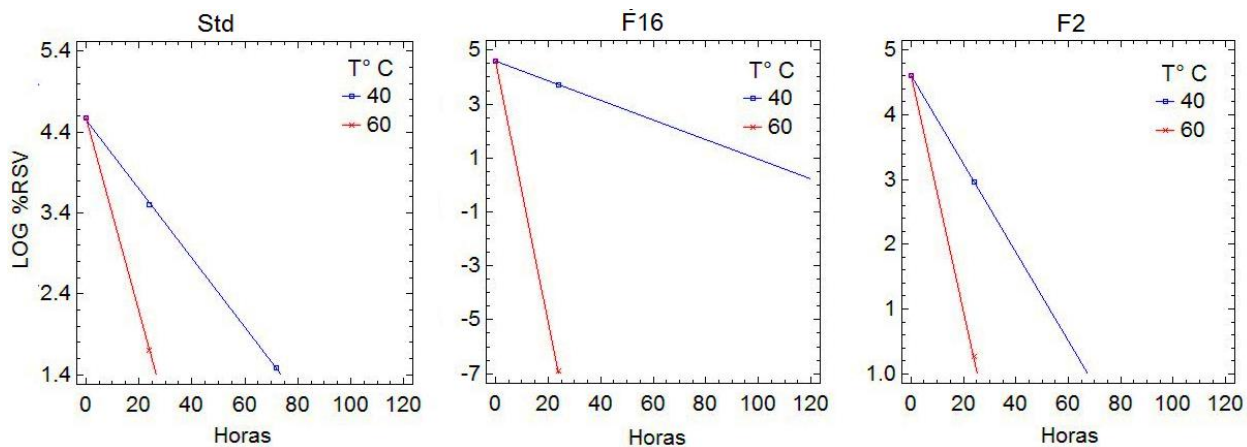


Gráfico 13. Comparación de líneas de regresión de cada analito de NaOH 0.1 N.



Con los resultados de las pendientes obtenidas de cada analito y condición de temperatura, se aplicó la ecuación de Arrhenius para cada una, resultando los esquemas del Gráfico 14.

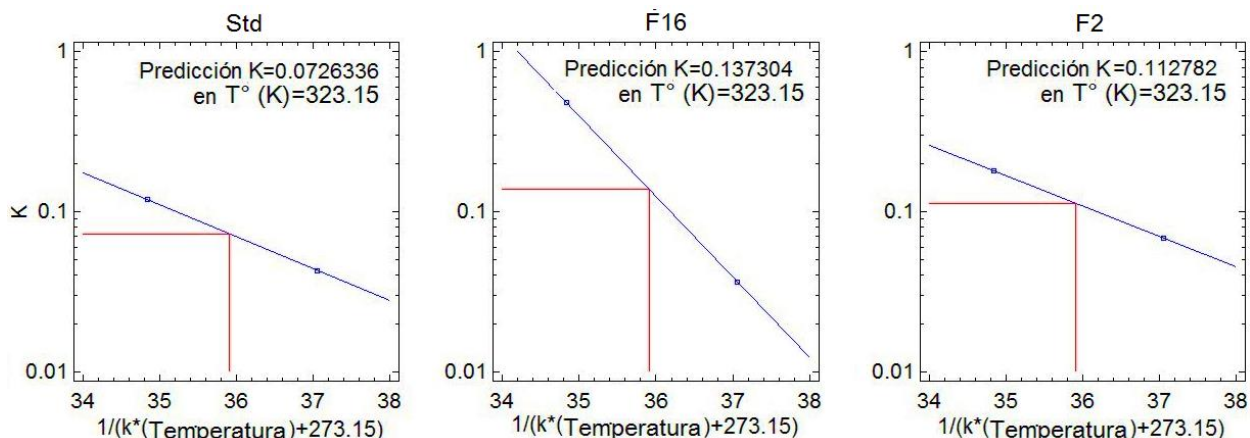


Gráfico 14. Esquemas de la Ecuación de Arrhenius para NaOH 0.1 N.

En la Tabla 31 se encuentran las pendientes de cada analito y su respectiva ecuación de Arrhenius, con la cual se estimó un valor de t_{90} de 2.47, 2.89 y 1.54 horas para STD, F16 y F2 respectivamente a la temperatura de 40°C, mientras que para la temperatura de 60°C los valores de t_{90} obtenidos son de 0.88, 0.22 y 0.58 horas. Con forme a los valores obtenidos se deduce que el resveratrol en las tres muestras evaluadas, la hidrólisis básica presenta mayor degradación en comparación de la hidrólisis ácida, con respecto al grupo de Formulación control.

Tabla 31. Ecuación de Arrhenius para NaOH 0.1 N.

Analito	T °	Intercepto	Pendiente	K	Ecuación de Arrhenius	K _{estimada}	t ₉₀ (h)
Estándar	40° C	4.5541	-0.0428	0.0428	$K=1.18 \cdot 10^6 \cdot e^{(-0.46/(kb \cdot (T^{\circ}C+273.15)))}$	0.04	2.47
	60° C	4.5704	-0.1196	0.1196		0.12	0.88
F16	40° C	4.5941	-0.0363	0.0363	$K=1.70 \cdot 10^{17} \cdot e^{(-1.16/(kb \cdot (T^{\circ}C+273.15)))}$	0.04	2.89
	60° C	4.600	-0.4795	0.4795		0.48	0.22
F2	40° C	4.603	-0.0682	0.0682	$K=7947 \cdot e^{(-0.44/(kb \cdot (T^{\circ}C+273.15)))}$	0.07	1.54
	60° C	4.603	-0.1811	0.1811		0.18	0.58

T° = Temperatura
K= Pendiente * (-1)

kb = constante de Boltzmann (8.617E-5 EV/grados K)
K_{estimada}= calculada con la ecuación de Arrhenius



6.3.2. Degradación forzada de resveratrol por oxidación

Los porcentajes de recuperación obtenidos en el ensayo de oxidación para las muestras de resveratrol estándar, formulación 2 y formulación 16 se muestran en la Tabla 32, en donde se observa que la formulación 2 tiene mayor estabilidad a 40°C, mientras que a 60°C es la muestra del estándar. Con los datos obtenidos se realizó una comparación de las líneas de regresión para cada muestra evaluada del logaritmo del porcentaje de recuperación en función de horas.

Tabla 32. Resultados de estabilidad en condiciones de oxidación.

Temperatura	Horas	%RSV_STD	%RSV_F16	%RSV_F2
40° C	0	96.12	99.99	99.82
	24	77.96	82.09	68.83
	72	49.34	43.48	56.37
	120	15.43	29.42	43.52
60° C	0	96.30	100.29	99.82
	24	28.12	0	18.35
	72	0	0	0
	120	0	0	0

En la Figura 32 se encuentran los cromatogramas obtenidos del grupo Peróxido control por cada temperatura y día de medición, en donde se puede observar solo un pico de respuesta, al minuto 0.9, sin embargo, no representó interferencia en la medición de t-RSV, ya que no manifestó crecimiento de área en las lecturas del grupo de H₂O₂ al 3%, ni interferencia con algún otro pico de respuesta, pero si disminuyó su área con la exposición térmica.

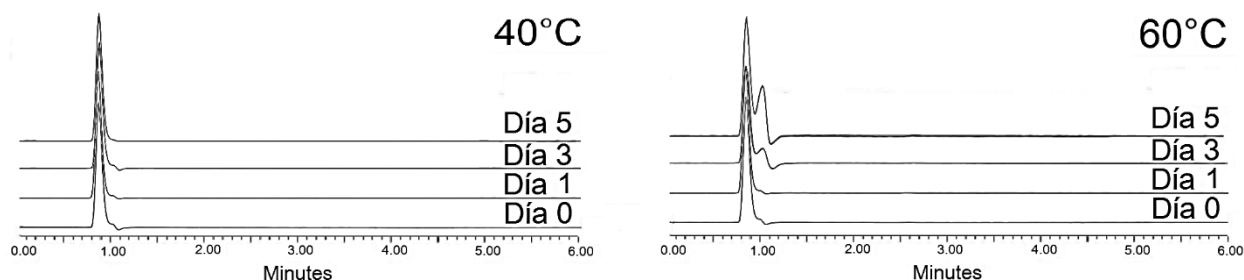


Figura 32. Comparación de cromatogramas del grupo Peróxido control por día.



En el grupo de oxidación H_2O_2 3% se hicieron diluciones de cada muestra, estándar, formulación 2 y formulación 16, a una concentración de $4.2 \mu\text{g/mL}$ de resveratrol, aforados con peróxido de hidrógeno al 3% y sometidos a 40°C y 60°C con el fin de lograr una degradación forzada tipo oxidativa. En el Gráfico 15 se encuentran los esquemas de regresión lineal de cada muestra en donde observa que en condiciones de oxidación a 40° la formulación 16 presenta mejor estabilidad, seguido de la formulación 2, mientras que el estándar se degrada más rápido. A una temperatura de 60°C la muestra de STD se degrada antes de las 40 horas, mientras que la formulación 2 y 16, tienen el mismo patrón de estabilidad, degradándose poco después de las 20 horas.

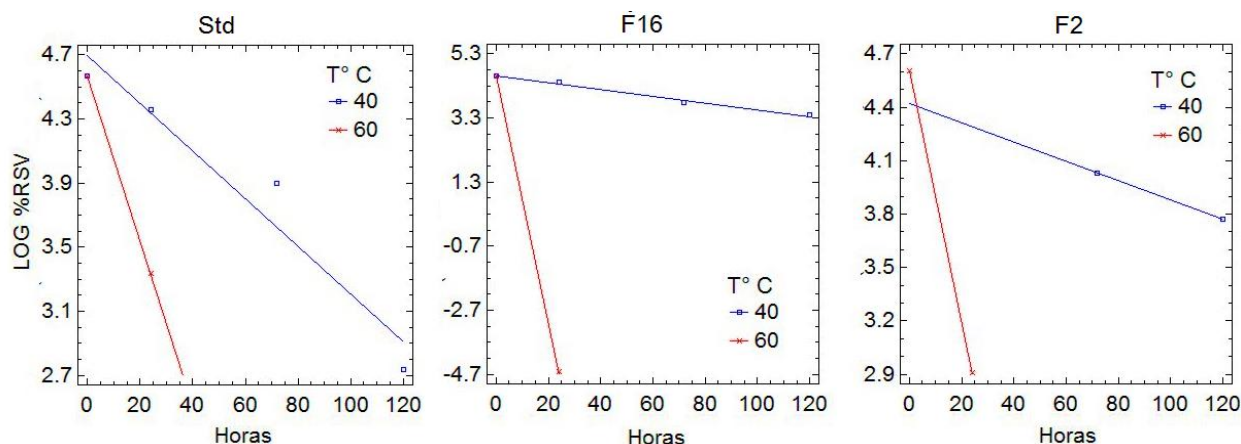


Gráfico 15. Comparación de líneas de regresión de cada analito de H_2O_2 3%.

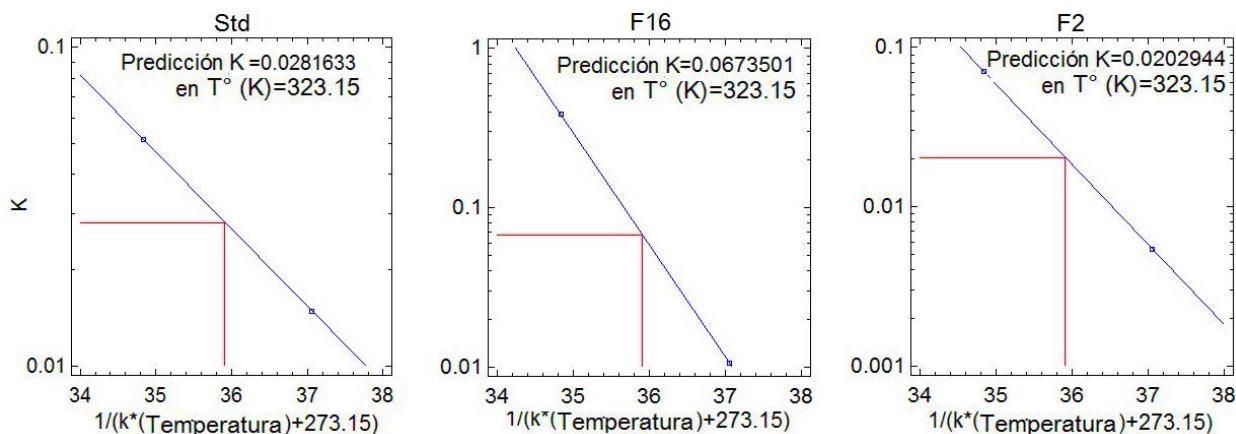


Gráfico 16. Esquemas de la Ecuación de Arrhenius para H_2O_2 3%.



Con los resultados de las pendientes obtenidas de cada analito y condición de temperatura, se aplicó la ecuación de Arrhenius para cada una, resultando los esquemas del Gráfico 16.

En la Tabla 33 se muestra la ecuación de Arrhenius para cada analito. El estándar tiene un t90 de 7.06 horas, y a 60° C el t90 fue de 2.05 horas, para la formulación 16 a 40°C el t90 fue de 9.93 horas, y a 60°C de 0.2737 horas. En el caso de la formulación 2 se estimó un t90 de 19.48 horas y 1.49 horas para 40° y 60°C respectivamente. En este caso las formulaciones y el estándar sufrieron una degradación muy rápida, sin embargo, las formulaciones que presentaron oxidación más lenta fue la muestra estándar a 40°C y la formulación 2 a 60°C.

Tabla 33. Ecuación de Arrhenius para H2O2 3%.

Analito	T °	Intercepto	Pendiente	K	Ecuación de Arrhenius	Kestimada	t90 (h)
Estándar	40° C	4.6930	-0.0149	0.0149	$K = 1.33 \cdot 10^{17} \cdot e^{(-0.56 / (kb \cdot (T^{\circ}C + 273.15)))}$	0.015	7.06
	60° C	4.5674	-0.0513	0.0513		0.051	2.05
F16	40° C	4.6126	-0.0106	0.0106	$K = 1.02 \cdot 10^{24} \cdot e^{(-1.62 / (kb \cdot (T^{\circ}C + 273.15)))}$	0.011	9.93
	60° C	4.6080	-0.3839	0.3839		0.384	0.27
F2	40° C	4.4200	-0.0054	0.0054	$K = 2.18 \cdot 10^{16} \cdot e^{(-1.16 / (kb \cdot (T^{\circ}C + 273.15)))}$	0.005	19.48
	60° C	4.6034	-0.0706	0.0706		0.071	1.49

T° = Temperatura
K= Pendiente * (-1)

kb = constante de Boltzmann (8.617E-5 EV/grados K)
Kestimada= calculada con la ecuación de Arrhenius

6.3.3. Degradación forzada de resveratrol térmica

Para el ensayo térmico de las muestras de resveratrol evaluadas, se utilizaron diluciones a una concentración de 4.2 µg/mL de t-RSV, las cuales fueron sometidas a 4°, 25°, 40° y 60° C.

Los porcentajes de recuperación obtenidos en el ensayo en condiciones térmicas para las muestras de resveratrol estándar, formulación 2 y formulación 16 se muestran en la Tabla 34, en donde se puede observar que el mayor porcentaje de recuperación de resveratrol a 4°C el comportamiento es similar para STD, F2 Y F16, a 25° C la muestra STD y F16, tiene la misma tendencia de degradación, mientras que para la formulación 2 fue mayor. A 40°C la degradación fue mayor para F16, y menor para la muestra STD, mientras que la F2 fue la de menor degradación. A 60°C la



degradación del estándar fue más lenta, mientras que las muestras de formulación 2 y 16, su degradación fue muy rápida.

Tabla 34. Resultados de estabilidad en condiciones térmicas.

Temperatura	Horas	% RSV_STD	%RSV_F16	%RSV_F2
4° C	0	100.08	100.21	99.82
	24	99.68	98.96	97.38
	72	99.04	98.09	96.62
	120	98.06	97.23	95.37
25° C	0	99.67	99.78	99.82
	24	98.83	99.55	96.61
	72	97.28	97.08	93.96
	120	91.27	93.53	88.76
40° C	0	98.45	99.39	99.82
	24	96.22	97.69	96.40
	72	87.39	82.81	88.43
	120	70.79	65.23	75.84
60° C	0	98.86	99.11	99.82
	24	94.19	44.37	89.36
	72	85.24	24.95	49.39
	120	67.76	8.31	4.40

Con los datos obtenidos se realizó una comparación de las líneas de regresión para cada analito evaluado de logaritmo del porcentaje de recuperación de resveratrol en función de horas, el cual se muestra en el Gráfico 17.

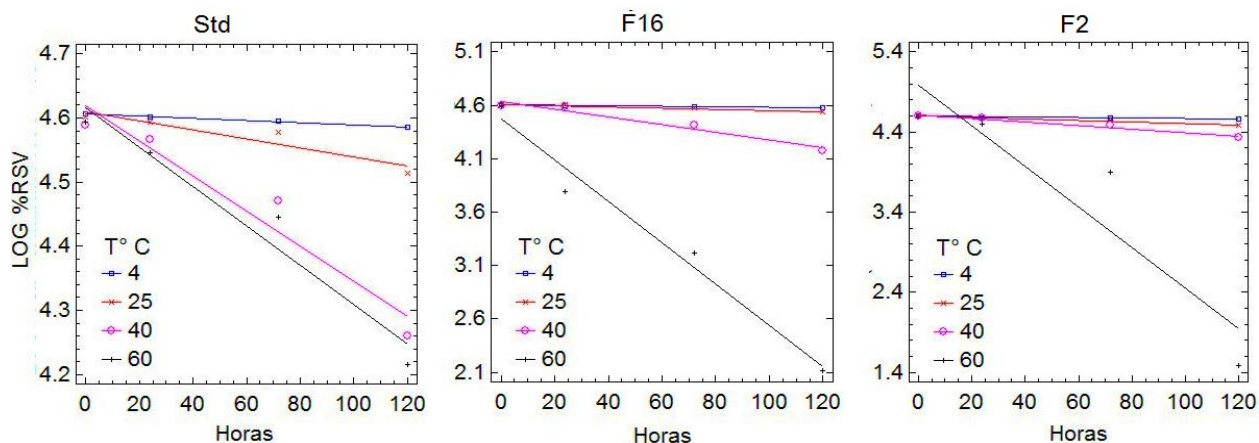


Gráfico 17. Comparación de líneas de regresión de cada analito en condiciones térmicas.

Con los resultados de las pendientes obtenidas de cada muestra y condición de temperatura, se aplicó la ecuación de Arrhenius para cada una, resultando los esquemas del Gráfico 18.

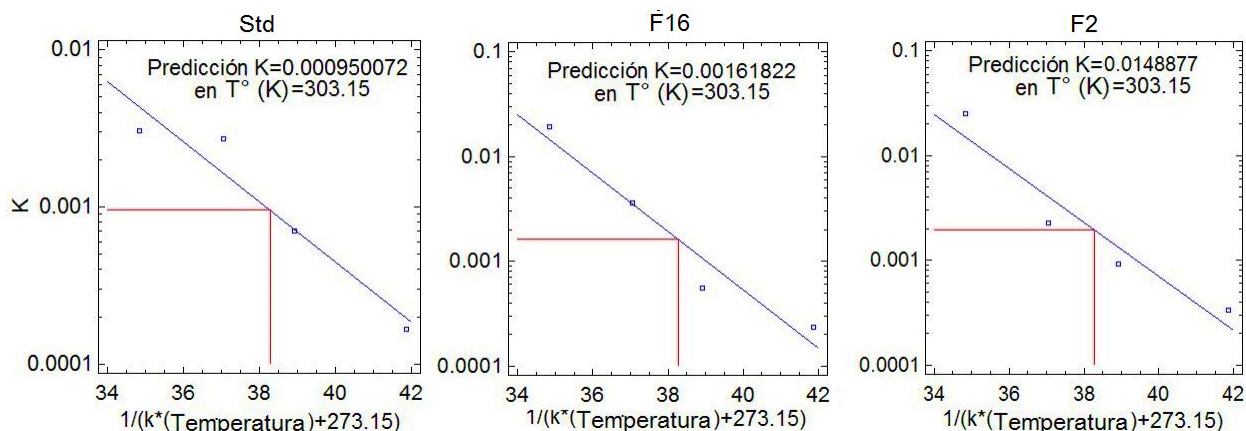


Gráfico 18. Esquemas de la Ecuación de Arrhenius en condiciones térmicas.

En la Tabla 35 se muestra la ecuación de Arrhenius para cada analito y temperatura. A 4°C en la formulación 16, tuvo el t_{90} más alto con 650.77 horas, mientras que la formulación 2 fue la más baja 457.94 horas. Para la temperatura ambiental, 25° C, la muestra de STD, fue la más alta con un t_{90} de 97.98 horas, y el más bajo fue de F2 con un t_{90} de 79.68 horas. A 40°C la t_{90} del estándar fue de 64.39, mientras que el de la formulación 16 fue de 29.6 horas, muy cercano al de la



formulación 16, con 26.39 horas. A la temperatura de 60°C el t₉₀ de F16 y F2 fue similar, de 7 horas, mientras que el del estándar fue de 24.09 horas.

Tabla 35. Ecuación de Arrhenius para condición térmica.

Analito	T °	Intercepto	Pendiente	K	Ecuación de Arrhenius	K _{estimada}	t ₉₀ (h)
Estándar	4° C	4.6062	-0.00017	0.00017	$K = 21081.3 * e^{(-0.44/(kb*(T^{\circ}C+273.15)))}$	0.0002	540.24
	25° C	4.6098	-0.00071	0.00071		0.0007	146.77
	40° C	4.6192	-0.00273	0.00273		0.0016	64.39
	60° C	4.6163	-0.00308	0.00308		0.0044	24.09
F16	4° C	4.6040	-0.00024	0.00024	$k = 7.63 * 10^7 * e^{(-0.64/(kb*(T^{\circ}C+273.15)))}$	0.0002	650.77
	25° C	4.6092	-0.00055	0.00055		0.0011	97.98
	40° C	4.6381	-0.00360	0.00360		0.0036	29.60
	60° C	4.4752	-0.01934	0.01934		0.0148	7.10
F2	4° C	4.5958	-0.00034	0.00034	$K = 1.39 * 10^7 * e^{(-0.59/(kb*(T^{\circ}C+273.15)))}$	0.0002	457.94
	25° C	4.6007	-0.00093	0.00093		0.0013	79.68
	40° C	4.6182	-0.00227	0.00227		0.0040	26.38
	60° C	4.9885	-0.02536	0.02536		0.0149	7.05

T° = Temperatura
K= Pendiente * (-1)

kb = constante de Boltzmann (8.617E-5 EV/grados K)
K_{estimada}= calculada con la ecuación de Arrhenius

6.3.4. Degradación forzada de resveratrol por fotólisis

Para el ensayo de degradación fotolítica se prepararon diluciones a una concentración de 4.2 µg/mL de t-RSV en etanol: agua (50:50), para cada una de las muestras, estándar formulación 2 y formulación 16. Los porcentajes de recuperación obtenidos de este ensayo de resveratrol estándar, formulación 2 y formulación 16 se muestran en la Tabla 36, en donde se puede observar que en luz ambiental las muestras de estándar y formulación 2 tienen un comportamiento similar de degradación, mientras que el de la formulación 16 su degradación es mayor. En oscuridad la degradación del estándar es mínima, mientras que la de la F2 y F16 es similar, pero con mayor degradación en comparación con él estándar. A una longitud de onda de 365 nm la formulación



16, fue la que obtuvo el mayor porcentaje de degradación, seguido de la formulación 2, mientras que la muestra estándar, su degradación fue casi por completo, recuperando solo el 1.07% de t-RSV. Con los datos obtenidos se realizó una comparación de las líneas de regresión para cada analito evaluado del Porcentaje de recuperación en función de Horas (Gráfico 19).

Tabla 36. Resultados de estabilidad en condiciones de fotólisis

Condición de Luz	Horas	%RSV_STD	%RSV_F16	%RSV_F2
Ambiente	0	98.82	100.22	99.82
	24	98.15	95.69	94.56
	72	95.70	89.18	92.22
	120	85.60	36.51	84.95
Oscuro	0	99.46	100.24	99.82
	24	98.47	99.63	91.74
	72	98.09	93.18	88.90
	120	97.48	84.47	85.02
365 nm	0	98.49	99.96	99.82
	24	17.94	59.90	16.74
	72	15.34	47.61	12.84
	120	1.07	30.35	11.19

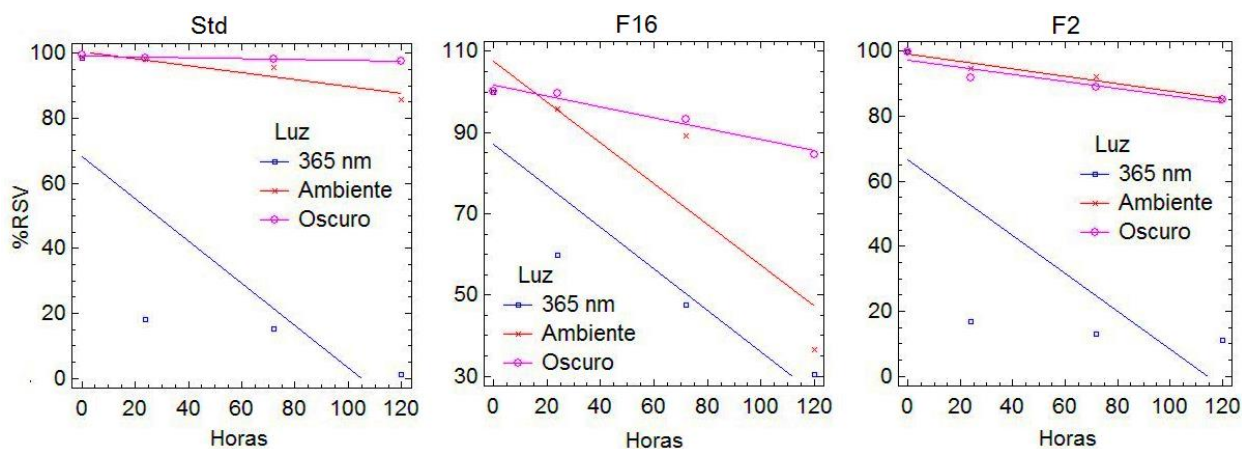


Gráfico 19. Comparación de líneas de regresión de cada analito en condición de fotólisis.



6.3.5. Cambio de color en las soluciones sometidas a degradación forzada

Para esta evaluación solo se tomaron en cuenta las soluciones de t-RSV que presentaron cambios de color durante su exposición a degradación forzada, las cuales se muestran en la Figura 33.

En el caso de las condiciones térmicas de 40°C y 60°C (Figura 33a), se observó en la Formulación 2, a 40°C, que las soluciones no presentaron cambios de coloración, pero a 60°C, el día 1, la solución presentó un color amarillo, el día 3, color naranja y el día 5, se tornó oscura, presentando un color café/grisáceo. Para la Formulación 16, a 40°C, desde el día 1 al día 5, presentó una coloración amarilla clara, mientras que, a 60°C, el día 1 y 3 presentó una coloración naranja, y el día 5 fue una coloración café claro. En el caso del estándar, no presentó cambios de color en ninguna de las dos temperaturas evaluadas.

Para las soluciones que contenían hidróxido de sodio 0.1 N (Figura 33b), se puede observar que el estándar presentó, tanto a 40°C como a 60°C, una coloración amarilla durante los 5 días de la evaluación. Para la Formulación 2 a 40°C y 60°C, se visualizó una coloración amarilla el día 1, mientras que para el día 3 y 5 presentó una coloración café claro. Para la formulación 16, desde su preparación las soluciones se tornaron amarillas claras, solo que no fue posible capturar el color en la fotografía; a temperatura de 40°C, el día 1, la solución se tornó amarillo y para el día 3 y 5, la solución presentó color naranja claro; a temperatura de 60°C, el día 1, la solución fue amarilla, para el día 2, naranja y el día 3 presentó color café claro.

De las soluciones preparadas con ácido clorhídrico 0.1 N (Figura 33c), las únicas soluciones que presentaron coloración fueron las de la formulación 16, las cuales se tornaron color amarillo en ambas temperaturas de 40°C y 60°C, durante los 5 días, pero en las soluciones de 40°C, además del color amarillo, el día 3 y 5, presentaron un precipitado color rojo/marrón. Esta formulación se degradó rápidamente a temperatura de 40°C, presentando en el día 3, 0% de recuperación de t-RSV, día en que apareció el precipitado, por lo cual se podría deducir que el sólido correspondía al analito.

Las soluciones expuestas a luz UV a $\lambda=365$ nm, (Figura 33d), para el día 1, la formulación 2 y 16 presentaron una coloración naranja claro, mientras que para el día 5 el color fue café claro. Se



presentó una coloración amarilla en el día 3 en ambas formulaciones, mientras que para las soluciones del estándar fue en los días 3 y 5.

En general, en las soluciones que presentaron cambios de coloración, se observó una tendencia de color, ya que cuando el principio activo, t-RSV, comenzaba a degradarse, la solución se tornaba en una coloración amarilla-naranja, que con el paso de los días se oscurecía, hasta llegar a una coloración café/grisácea. En la literatura no hay datos reportados de cambios de color en soluciones de t-RSV ocasionados por degradación, sin embargo, se puede atribuir a la naturaleza y composición de la cual proviene la materia prima del principio activo, los excipientes y a la interacción que causan los productos de degradación de estos en la solución.

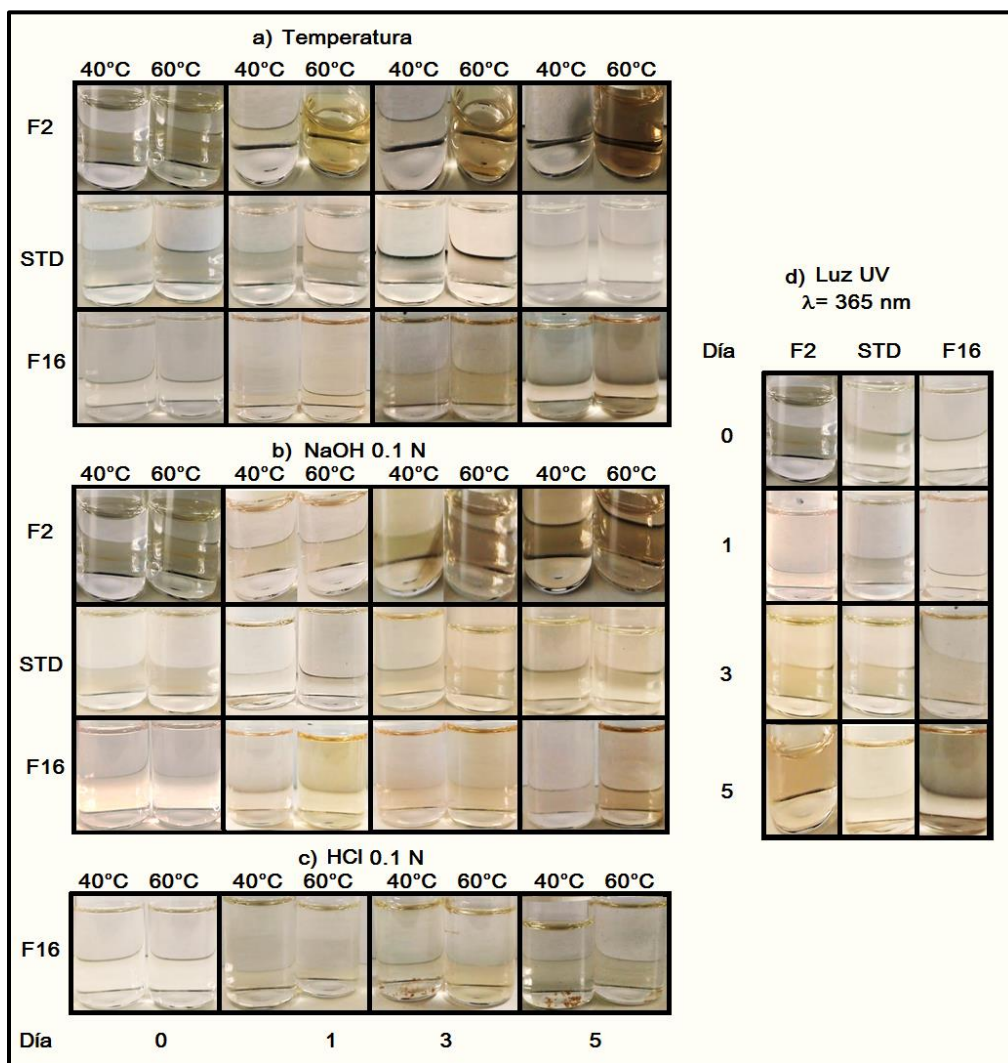


Figura 33. Cambio de color en las soluciones de t-RSV en condiciones de degradación forzada.



6.3.6. Comparación de cromatogramas obtenidos en el ensayo de estabilidad

Los cromatogramas del método indicativo de estabilidad, mostraron la eficiencia de la metodología desarrollada y validada por HPLC acoplado a DAD para evaluar la estabilidad de resveratrol en formulación parenteral, en los cuales se observa que la detección es específica de *trans*-resveratrol durante el estudio de estabilidad realizado, en la cual el pico del analito decrece a causa de la degradación forzada, pero no presenta interferencia en el tiempo de retención del analito por algún otro producto de degradación, en ninguna de las condiciones evaluadas, por lo cual el método creado es específico y apto para el uso desarrollado.

Cromatogramas de hidrólisis

En el caso de los cromatogramas para el grupo Formulación control (Anexo 11.2.1.) se puede observar que la formulación 2 a 40°C, partir del día 1, se empieza a notar un pico pequeñamente significativo al minuto 1.0, y en el día 3 aparece otro pico pequeño en 0.7 min; estos 2 picos coinciden a 60°C del día 1 en delante de la formulación 2 y 16. En la F16 en el día 3 y en la F2 el día 5, se presentan picos cromatográficos a 1.8 minutos. Así mismo el día 5 en F2 y F16, a 60°C, se aprecia otro pico cromatográfico en el tiempo de retención de 1.4. y 3.2 minutos, el cual puede ser resveratrol, sin embargo, faltarían realizar otro tipo de estudios para confirmar.

Se podría pensar que estos picos no son productos de degradación de *trans*-resveratrol, ya que en la muestra de estándar no aparecen productos de degradación que podrían ser atribuidos a la estabilidad de los excipientes utilizados en la formulación, sin embargo, aparecen en el análisis del grupo NaOH 0.1 N.

Para el grupo HCl 0.1 N (Anexo 11.2.1.) se vuelven a observar los picos a tiempo de retención de 1.0, 1.4 y 1.8 minutos a 40°C en la F2 a partir del día 1 y en F16 en el día 3. A la temperatura de 60°C, en F2 y F16 se empieza a notar el pico de 1 min., pero su respuesta es insignificante.

En el grupo de NaOH 0.1 N (Anexo 11.2.1.), a partir del día 1, tanto en la muestra del estándar, como en las muestras de la formulación 2 y formulación 16, se empiezan a notar los picos en los tiempos de 0.7, 1.0, 1,4 y 1.8 min. En las muestras del estándar en el día 5 aparece un nuevo pico en el minuto 4.1, tanto a 40°, como a 60°C, el cual pertenece a *cis*-resveratrol. En la formulación



2 a 40° y 60°C, a partir del día uno aparece otro pico de degradación a los 5 minutos y desaparece el día 5, en ambas temperaturas evaluadas.

Cromatogramas de oxidación

En el caso del grupo de H₂O₂ al 3% (Anexo 11.2.2.), no se observan otros picos de degradación, solo disminuye el área del pico de resveratrol, hasta su completa desaparición. A temperatura de 40°C en el STD, el área de pico comenzó a decrecer desde el primer día, recuperando el 77.96% de t-RSV, llegando al día 5 con solo 15.43%, para la F16, el día 1 se recuperó solo el 82.09%, y para el quinto día se detectó solo el 39.42% de t-RSV. En la F2 se presentó mayor disminución de pico el día uno, recuperando el 68.83%, pero presentó mayor porcentaje al quinto día con 43.52% de t-RSV. Mientras que para la temperatura de 60°C la disminución del pico cromatográfico fue más rápida, presentó una recuperación de t-RSV en el día 1 de solo el 28.12% para STD, de 18.35%, que para la F12 y para la F16 la recuperación fue nula. Para el día 3 el STD y la F2, ya no presentaron recuperación de t-RSV.

Cromatogramas de análisis térmico

Los cromatogramas pertenecientes a este grupo se muestran en el Anexo 11.2.3. En el caso del estándar a 4°C el día 5 aparece un pico a los 5 min (el mismo de la formulación 2 del grupo NaOH 0.1 N). A partir del día 1 a 4°C y 25°C en la F2 se presentan los picos de 0.7 y 1 minutos. A 40 y 60°C se repiten los picos anteriormente descritos para el grupo Formulación control.

Cromatogramas de Fotólisis

En el Anexo 11.2.4., se muestran los cromatogramas del estudio fotolítico, en los cuales se observa la presencia del pico de 5.0 min en la muestra de estándar el día 1 en luz ambiental y en la formulación 2 el día 5, en ambiente oscuro.

A una longitud de onda de 365 nm, a partir del día 1, se empezó a mostrar el pico perteneciente a *cis*-resveratrol en el minuto 3.9, por otro lado, a partir del día 5, el pico del minuto 1.0 se presentó en los cromatogramas del estándar, mientras que en las formulaciones 2 y 16 fue a partir del día 1. En el día 5 también en la muestra del estándar se puede observar el pico de 0.7 y 1.4 minutos, mientras que en la formulación 2, aparecen desde el día 1.



Espectros de productos de degradación

En la Figura 34 se encuentran los espectros de absorción obtenidos de los picos cromatográficos de los productos de degradación de *trans*-resveratrol.

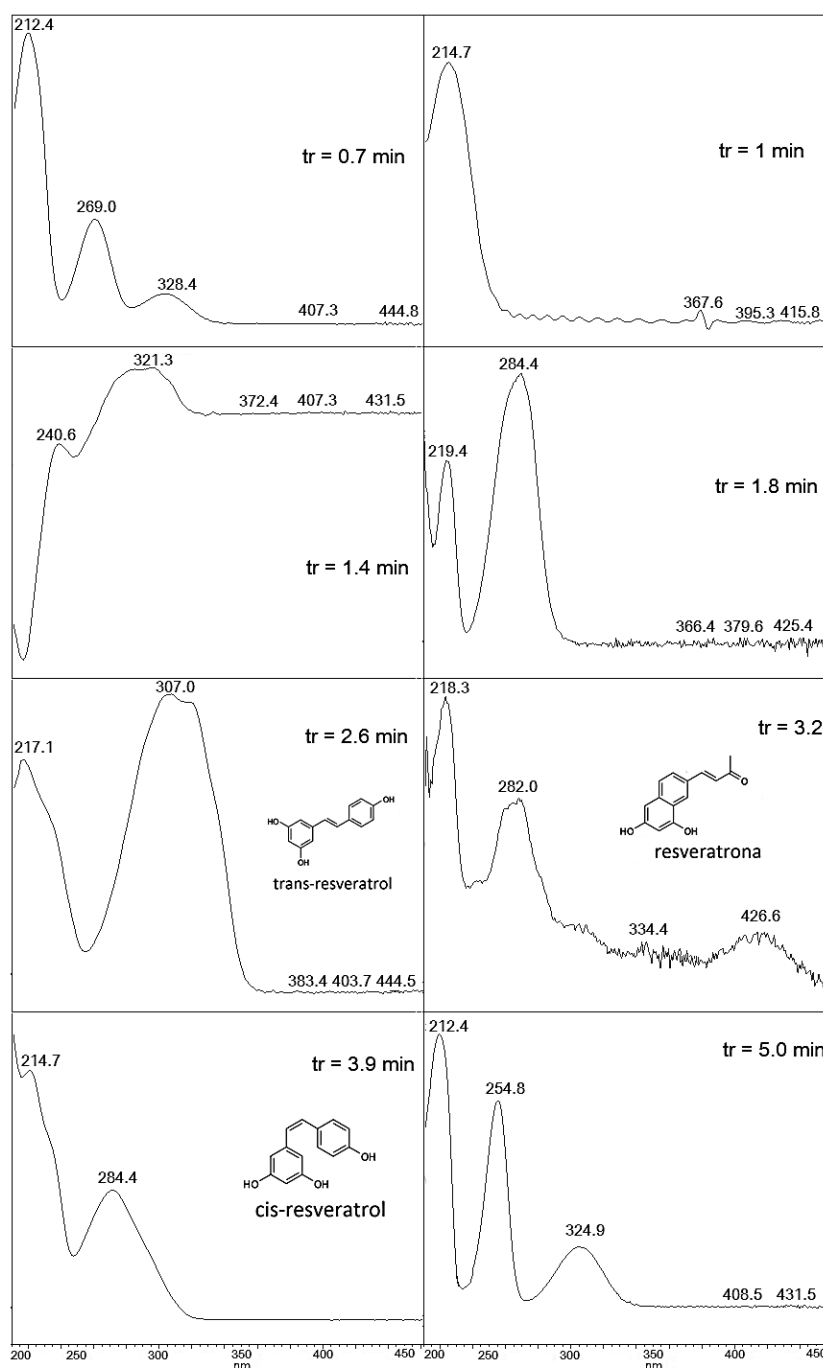


Figura 34. Espectros de productos de degradación de *t*-RSV



7. Conclusiones

- Mediante la investigación documental fue posible conocer las características del analito, *trans*-resveratrol, que permitieron establecer las condiciones de tratamiento de la muestra.
- Se desarrolló un método analítico indicativo de estabilidad para cuantificar *trans*-resveratrol en muestras de formulación parenteral mediante HPLC acoplado a DAD, obteniendo a t-RSV en $t_r=2.6$ min, con fase móvil Formiato de amonio pH=4, 10 mM/ Acetonitrilo (70:30) a velocidad de flujo de 0.9 mL/min, a $\lambda=307$ nm.
- Se cumplió con los criterios de aceptación establecidos para cada una de las características de desempeño que establecen ambas guías de validación ICH Q2 y EURACHEM, demostrando los siguientes parámetros:
 - Rango lineal en un intervalo de concentraciones de 0.125 a 64 $\mu\text{g/mL}$ de resveratrol.
 - El método demostró ser lineal en concentraciones comprendidas entre 0.525 a 16.8 $\mu\text{g/mL}$ de resveratrol.
 - El método es selectivo a t-RSV ante los componentes de la muestra de las Formulaciones 2 y Formulaciones 16.
 - El método es preciso y exacto en niveles del 80 a 120% de concentración de t-RSV.
 - Repetible y reproducible entre días y analistas, obteniendo C.V. global de 0.40%.
 - Se determinó el límite de cuantificación y límite de detección de t-RSV de 0.176 $\mu\text{g/mL}$ y 0.058 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.
 - Se comprobó la robustez del método ante cambios en pH, fase móvil, número de serie de la columna, volumen de inyección y equipo.
- El método desarrollado y validado para evaluar la estabilidad de t-RSV en formulación parenteral, en comparación con algunos métodos reportados, obtuvo menor tiempo de retención en comparación con el método más actual, Kurangi, B., et al en 2019, el cual fue de 2.6 minutos; de igual forma se obtuvieron límites de cuantificación y detección en menor concentración para el analito, en comparación con los reportados por Careri, M., et al en 2003, Katsagonis, A., et al en 2005 y Zupančič, S., et al en 2015.



- Se estableció un método indicativo de estabilidad para muestras de resveratrol estándar, Formulación 2 y Formulación 16, en condiciones de hidrólisis, oxidación, térmicas y de fotólisis, el cual demostró que el método desarrollado y validado para la estabilidad de resveratrol en formulación parenteral por medio de HPLC acoplado a DAD, es específico y eficiente para su uso, encontrando que la estabilidad de t-RSV es alterada por hidrólisis básica, temperaturas mayores de 40°C, luz UV $\lambda=365$ nm y ambiental, condiciones que presentaron menor porcentaje de recuperación de t-RSV.
- Se estimó el valor de t_{90} , por medio de la ecuación de Arrhenius, para las soluciones en condición oxidativa, térmica y de hidrólisis, obteniendo mayor tiempo de estabilidad en condiciones térmicas de 4°C.
- También se observó un cambio de coloración cuando el principio activo, t-RSV, comenzaba a degradarse, las soluciones se tornaban en una coloración amarilla-naranja, que con el paso de los días se oscurecía, hasta llegar a una coloración café/grisácea.
- Se encontraron picos de degradación de t-RSV, a los tiempos de retención de 0.7 min, 1.0 min, 1.4 min, 1.8 min y 5.0 min. El pico de c-RSV se encontró en $t_r=3.9$ min. En un $t_r=3.2$ se encontró un pico de degradación que se sugiere puede ser resveratrolona.



8. Aplicación

La metodología analítica, desarrollada y validada por HPLC acoplada a DAD servirá para:

- La identificación y cuantificación específica de *trans*-resveratrol en presencia de su principal isómero y/o producto de degradación, *cis*-resveratrol.
- La evaluación de la estabilidad de resveratrol en una formulación parenteral de acuerdo a la NOM-073-SSA1-2005.

9. Perspectivas

- Verificar la estabilidad de almacenado de la muestra para conocer en qué condiciones y tiempos puede dar resultados confiables.
- Realizar otros criterios de robustez como temperatura y otras marcas de columna.
- Adaptar la metodología desarrollada para otro tipo de productos farmacéuticos y muestras biológicas, como plasma, tejidos, orina, heces u otras.
- Evaluar la estabilidad de resveratrol por horas en condiciones de peróxido, hidróxido y luz a una longitud de onda a 365nm para obtener una mejor cinética de comportamiento.
- Realizar una metodología para identificar las estructuras moleculares de los otros productos de degradación de *trans* y *cis*-resveratrol generados por condiciones de estrés.
- Desarrollo y validación para otros productos de degradación de *trans* y *cis*-resveratrol.
- Realizar la farmacocinética de productos de degradación de *trans* y *cis*-resveratrol para evaluar si presentan efectos farmacológicos.



10. Referencias

1. Baur, J. A. & Sinclair, D. A. (2006) Therapeutic potential of resveratrol: the in vivo evidence. *Nature Reviews Drug Discovery*, 5, 493–506. DOI: 10.1038/nrd2060
2. Biasutto, L., Marotta, E., Garbisa, S., Zoratti, M. & Paradisi, C. (2010) Determination of Quercetin and Resveratrol in Whole Blood - Implications for Bioavailability Studies. *Molecules*, 15 (9), 6570-6579. DOI: 10.3390/molecules15096570
3. Blessy, M. Patel, R. D., Prajapati, P. N. & Agrawal, Y. K. (2014) Development of forced degradation and stability indicating studies of drugs—A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4 (3), 159-165. DOI: 10.1016/j.jpha.2013.09.003
4. Camont, L., Cottarta, C.H., Rhayem, Y. & Col. (2009) Simple spectrophotometric assessment of the trans-/cis-resveratrol ratio in aqueous Solutions. *Analytica Chimica Acta*, 634 (1), 121-128. DOI: 10.1016/j.aca.2008.12.003
5. Careri, M., Corradini, C., Elviri, L., Nicoletti, E., & Zagnoni, I. (2003) Direct HPLC Analysis of Quercetin and trans-Resveratrol in Red Wine, Grape, and Winemaking Byproducts, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (18), 5226-5231. DOI: 10.1021/jf034149g
6. Cheng, K., Yan E., Song, Z. & Li, Z. (2019) Protective effect of resveratrol against hepatic damage induced by heat stress in a rat model is associated with the regulation of oxidative stress and inflammation. *Journal of Thermal Biology*, 82, 70-75. DOI: 10.1016/j.jtherbio.2019.03.012
7. Colom, H., Alfaras, I., Maijo, M., Juan, M. E., & Planas, J. M. (2011) Population Pharmacokinetic Modeling of trans-Resveratrol and Its Glucuronide and Sulfate Conjugates After Oral and Intravenous Administration in Rats. *Pharm Res*, 28, 1606–1621. DOI: 10.1007/s11095-011-0395-8
8. Coskun, O. (2016) Separation techniques: Chromatography. *North Clin Istanbul*, 3(2),156–60. DOI: 10.14744/nci.2016.32757
9. Crowell, J. A., Korytko, P. J., Morrissey, R. L., Booth, T. D. & Levine, B. S. (2004) Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicological sciences*, 82 (2), 614-619. DOI: 10.1093/toxsci/kfh263



10. Dirks Naylor, A. J. (2009) Cellular effects of resveratrol in skeletal muscle. *Life Sciences*, 84 (19-20), 637-640.
11. Eurolab España. P.P. Morillas & colaboradores (2016) Guía Eurachem: La adecuación al uso de los métodos analíticos: Una Guía de laboratorio para la validación de métodos y temas relacionados. Recuperada de:
https://www.eurachem.org/images/stories/Guides/pdf/MV_guide_2nd_ed_ES.pdf
12. FEUM (2010) Cromatografía. Recuperado de:
<https://www.farmacopea.org.mx/Repositorio/Documentos/265.pdf>
13. Gaspar Tosatoa, M. & Lorente, C (2018) Clearing up the photochemistry of resveratrol: Effect of the solvent. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 367, 327-331. DOI: 10.1016/j.jphotochem.2018.08.050
14. Gómez Iglesias, M. N. (2017) Cromatografía repaso. Recuperado de:
<https://slideplayer.es/slide/11713294/>
15. Gismera García, M. J., Quintana Mani M. C. & Silva de Campos, M. P. (2009) Introducción a la Cromatografía Líquida de Alta Resolución. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid.
16. Herráez, A. (2006) Clasificación de las técnicas cromatografía. Recuperado de:
<http://biomodel.uah.es/tecnicas/crom/inicio.htm>
17. Huang, H., Zhang, J., Chen, G., Lu, Z., Wang, X., Sha, N., Shao, B., Li, P., & Guo, D. (2008) High performance liquid chromatographic method for the determination and pharmacokinetic studies of oxyresveratrol and resveratrol in rat plasma after oral administration of Smilax china extract, *Biomedical Chromatography*, 22, 421-427. DOI: 10.1002/bmc.950
18. ICH (2003) Harmonised Tripartite Guideline Stability Testing of New Drug Substances and Products Q1a (R2). Recuperada de:
https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/QA_R2/Step4/Q1A_R2_Guideline.pdf
19. ICH (2005) Harmonised Tripartite Guideline, Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). Recuperada de:
https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf



20. Iranshahy, M., Mohammadpoor, A. H., Hassanzadeh-Khayy, M. & Iranshahi, M. (2013) Method Validation for the One-Month Stability Study of trans-Resveratrol in Human Plasma, *J Nat Pharm Prod*, 8 (2); 65-9. PubMed PMID: 24624190; PubMed Central PMCID: PMC3941911.
21. Jang, M. & Pezzuto, J.M. (1999) Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Drugs under Experimental and Clinical Research*, 25 (2-3), 65-77. PubMed ID: 10370867
22. Juan, M.E., Vinardell, M. P. & Planas, J. M. (2002) The daily oral administration, of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *The Journal of Nutrition*, 132 (2), 257-260. DOI: 10.1093/jn/132.2.257
23. Katsagonis, A., Atta-Politou, J., & Koupparis M. A (2005) HPLC Method with UV Detection for the Determination of trans-Resveratrol in Plasma, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 28, 1393–1405. DOI: 10.1081/JLC-200054884
24. Kumar, S., Lather, V., & Pandita, D. (2016) Stability indicating simplified HPLC method for simultaneous analysis of resveratrol and quercetin in nanoparticles and human plasma, *Food Chemistry*, 197 (A), 959-964. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.11.078.
25. Kurangi, B.; Jalalpure, S. & Jagwani, S. (2019) A validated stability-indicating HPLC method for simultaneous estimation of resveratrol and piperine in cubosome and human plasma. *Journal of Chromatography B*, (1122–1123), 39-48. DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.05.017
26. Liqid, A., Palma, M., Brigui, J. & Barroso, C. G. (2007) Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction, *Journal of Chromatography A*, 1140 (1–2), 29-34. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.11.040
27. MNCN (s. f.) Conceptos fundamentales de cromatografía. Recuperado de: http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/principios_de_cromatografia.pdf
28. Miranda, A. & Martín, O. (2013) Cromatografía Líquida (HPLC). Recuperado de: <https://www.ucm.es/data/cont/docs/650-2013-12-02-gases%201%C3%ADquidos.pdf>
29. National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Resveratrol, CID=445154, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Resveratrol>
30. Norma Oficial Mexicana NOM-073-SSA1-2005, Estabilidad de fármacos y medicamentos. Recuperado de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/073ssa105.html>



31. Pandey, K. B. & Rizvi, S. I. (2011) Anti-oxidative action of resveratrol: Implications for human health. *Arabian Journal of Chemistry*, 4 (3), 293-298.
DOI: 10.1016/j.arabjc.2010.06.049
32. Omar, J. M., Yang, H., Li, S., Marquardt, R. R. & Jones, P. J. H. (2014) Development of an Improved Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography Method for the Simultaneous Analyses of trans-/cis-Resveratrol, Quercetin, and Emodin in Commercial Resveratrol Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 (25), 5812-5817. DOI: 10.1021/jf5001277
33. OMS (2008) Directrices para las pruebas de estabilidad de productos farmacéuticos que contienen sustancias medicamentosas bien establecidas en formas farmacéuticas corrientes. Recuperado de:
http://new.paho.org/hq/dmdocuments/2008/5_Anexo_5_del_informe_34.pdf
34. Rocha Lindner, G., Maissar Khalil, N. & Mara Mainardes, R. (2013) Resveratrol-Loaded Polymeric Nanoparticles: Validation of an HPLC-PDA Method to Determine the Drug Entrapment and Evaluation of Its Antioxidant Activity, *The Scientific World Journal*. DOI: 10.1155/2013/506083
35. Rodríguez-Cabo, T. Rodríguez, I., Ramil, M. & Cela, R. (2015) Comprehensive evaluation of the photo-transformation routes of trans-resveratrol. *Journal of Chromatography A*, 1410, 129-139. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.07.088
36. Sengupta, P., Chatterjee, B. & Tekade, R. K. (2018) Current regulatory requirements and practical approaches for stability analysis of pharmaceutical products: A comprehensive review. *International Journal of Pharmaceutics*, 543, (1-2), 328-344.
DOI: 10.1016/j.ijpharm.2018.04.007.
37. Shah, B. P.; Jain, S.; Prajapati, K. K. & Mansuri, N. Y. (2012) Stability indicating HPLC method development: A review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(9): 2978-2988. ISSN: 0975-8232. Recuperado de: <http://ijpsr.com/bft-article/stability-indicating-hplc-method-development-a-review/?view=fulltext>
38. Sneha Lakshmi R.P. (2015) A Review on Chromatography with High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and its Functions. *Research and Reviews: Journal of Pharmaceutical Analysis*, 4. E-ISSN: 2320-0812; P-ISSN: 2347-2340.



39. Stojanović, S., Sprinz, H. & Brede, O. (2001) Efficiency and mechanism of the antioxidant action of trans-resveratrol and its analogues in the radical liposome oxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 391 (1), 79-89. DOI: 10.1006/abbi.2001.2388
40. Tabibiazar, M., Mohammadifar, M. A., Roufegarinejad, L. & Ghorbani, M. (2019) Improvement in dispersibility, stability and antioxidant activity of resveratrol using a colloidal nanodispersion of BSA-resveratrol. *Food Bioscience*, 27, 46-53. DOI: 10.1016/j.fbio.2018.10.015
41. Valdés Santurio, J. R. (2004) La estabilidad de productos farmacéuticos. *IMEFA*; 4 (5):1-16.
42. Waters Corporation (2014) What is the Difference Between UHPLC and UPLC? Recuperado de: <https://www.chromatographytoday.com/news/hplc-uhplc/31/breaking-news/what-is-the-difference-between-uhplc-and-uplc/30754>
43. Yu, C., Shin, Y. G., Chow, A. & Col. (2002) Human, Rat, and Mouse Metabolism of Resveratrol. *Pharmaceutical Research*, 19 (12), 1907-1914. DOI: /10.1023/A:1021414129280
44. Zupančič, S., Lavrič, z., & Kristl, J. (2015) Stability and solubility of trans-resveratrol are strongly influenced by pH and temperature. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 9, 196-204. DOI: 10.1016/j.ejpb.2015.04.002



11. Anexos



11.1. Preparación de soluciones

Solución diluyente

Medir aproximadamente 100 mL de Etanol grado ACS al 99.9% de pureza y 100 mL de Agua tipo 1 con ayuda de una probeta de 100 mL. Colocar ambas sustancias en un vaso de precipitado de 250 mL y mezclar con ayuda de una varilla de vidrio por 2 minutos.

Formiato de Amonio pH=4, 10 mM

Pesar exactamente 631 mg de Formiato de amonio, con 99.9% de pureza en un vaso de precipitado de 100 mL. Agregar 40 mL de agua tipo 1 al vaso de precipitado, y dejar reposar hasta completa disolución del FA (aproximadamente 5 min). Medir 200 μ L de Ácido Fórmico grado RA al 89.2% de pureza y agregar a la solución del vaso precipitado. Verter la solución del vaso precipitado a un matraz aforado de 1 litro. Realizar tres enjuagues al vaso precipitado con agua tipo 1. Llevar a volumen de aforo con agua tipo 1. Medir el pH con ayuda del potenciómetro. En caso de que el pH no sea igual a 4, ajustar con Ácido Fórmico. Posteriormente filtrar la solución al vacío con ayuda del matraz kitazato y el equipo de filtración, con papel Milipore tipo HVLP de 0.45 μ m de poro de partícula. Posterior a la filtración, vaciar la solución en recipiente de 1 L de boro silicato y desgasificar por 15 min con ayuda del ultrasonicador.

Solución de Acetonitrilo

Medir aproximadamente 500 mL de Acetonitrilo grado HPLC, al 99.9% de pureza, con ayuda de una probeta de 500 mL. Posteriormente filtrar la solución al vacío con ayuda del matraz kitazato y el equipo de filtración, con papel Milipore tipo HVLP de 0.45 μ m de poro de partícula. Posterior a la filtración, vaciar la solución en recipiente de 500 mL de boro silicato y desgasificar por 15 min con ayuda del ultrasonicador.



Solución de lavado de HPLC

Medir aproximadamente 250 mL de Metanol grado ACS al 99.9% de pureza y 100 mL de Agua tipo 1 con ayuda de una probeta de 250 mL. Colocar ambas sustancias en un vaso de precipitado de 500 mL y mezclar con ayuda de una varilla de vidrio por 2 minutos. Posteriormente filtrar la solución al vacío con ayuda del matraz kitazato y el equipo de filtración, con papel Milipore tipo HVLP de 0.45 μm de poro de partícula. Posterior a la filtración, vaciar la solución en recipiente de 500 mL de boro silicato y desgasificar por 15 min con ayuda del ultrasonicador.

Solución patrón de t-RSV: concentración de 21 $\mu\text{g/mL}$

Pesar en una pesa muestras 15 mg de t-RSV estándar al 99.9% de pureza, vaciar en un matraz aforado de 100 mL. Realizar tres enjuagues a la pesa muestras, con solución diluyente. Llevar a volumen de aforo con solución diluyente. Tomar un alícuota de 7 mL de la solución anterior y trasvasarla a un matraz de 50 mL, llevar a la marca de aforo con solución diluyente.

Solución estándar al 100% del analito: concentración de 4.2 $\mu\text{g/mL}$ de t-RSV

Medir 2 mL de solución patrón de t-RSV y colocar en un matraz aforado de 10 mL. Llevar a volumen de aforo con solución diluyente.

Soluciones del sistema

A partir de la solución patrón de t-RSV medir el volumen de analito, de acuerdo a la solución que se desee preparar (Tabla 37) y verter en un matraz aforado de 10 mL, llevar a volumen de aforo con solución diluyente.



Tabla 37. Volumen de analito requerido de t-RSV para cada solución del sistema.

Solución	Volumen de analito (mL)	Concentración de t-RSV ($\mu\text{g/mL}$)
1.	0.25	0.525
2.	0.5	1.050
3.	1.0	2.100
4.	2.0	4.200
5.	4.0	8.400
6.	8.0	16.800

Solución de placebo adicionado de t-RSV

Pesar la cantidad requerida de materia prima de resveratrol con 50% de pureza, de acuerdo con la solución que se desee preparar (Tabla 38) en una pesa muestras y vaciar en un matraz aforado de 25 mL. Realizar tres enjuagues a la pesa muestras, con placebo de F16. Llevar a volumen de aforo con placebo de F16. Tomar un alícuota de 1 mL de la solución anterior y trasvasarla a un matraz de 20 mL, llevar a la marca de aforo con solución diluyente. De esta última solución preparada medir un alícuota de 0.5 mL y verter en un matraz aforado de 25 mL, llevar a la marca de aforo con solución diluyente.

Tabla 38. Cantidad requerida de RSV materia prima para cada solución placebo adicionado.

Solución	Materia Prima (mg)	mg de t-RSV	Concentración ($\mu\text{g/mL}$)	Porcentaje (%)
1.	140.0	70.00	2.80	80.0
2.	157.5	78.75	3.20	90.0
3.	175.0	87.50	3.50	100.0
4.	192.5	96.25	3.90	110.0
5.	210.0	105.00	4.20	120.0



Soluciones del ensayo de estabilidad

Medir 0.5 mL de Formulación 2 o Formulación 16 y verter en un matraz aforado de 50 mL, llevar a volumen de aforo con solución diluyente. De esta solución tomar 3 mL y vaciar en un matraz aforado de 25 mL. Llevar a volumen de aforo con la solución correspondiente (Tabla 39).

Para la solución estándar de t-RSV, medir 5 mL de solución patrón de t-RSV y colocar en un matraz aforado de 25 mL. Llevar a volumen de aforo con la solución correspondiente (Tabla 39).

Tabla 39. Solución de aforo de acuerdo con el tipo de degradación.

Tipo de degradación	Condición Experimental	Solución de aforo
Hidrólisis	HCl 0.1 N	HCl 0.1 N
	NaOH 0.1 N	NaOH 0.1 N
	Formulación Control	Solución diluyente
Oxidación	H ₂ O ₂ 3%	H ₂ O ₂ 3%
Fotólisis	Luz: Oscuridad	Solución diluyente
	Luz 3: $\lambda=365$ nm	
	Luz: Ambiente	
Térmico	Cámara de calor 1	
	Cámara de calor 2	
	Cámara de calor 3	
	Cámara de calor 4	



11.2. Fórmulas

Media Aritmética	$\bar{x} = \frac{\sum y}{n}$
Desviación Estándar	$s = \sqrt{\frac{n(\sum y^2) - (\sum y)^2}{n(n-1)}}$
Coefficiente de variación	$CV = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$
Pendiente	$b_1 = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}$
Ordenada al origen	$b_0 = \frac{\sum y - b_1 \sum x}{n}$
Coefficiente de determinación	$r^2 = \frac{(n \sum xy - \sum x \sum y)^2}{(n \sum x^2 - (\sum x)^2)(n \sum y^2 - (\sum y)^2)}$
Intervalo de confianza	$IC = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \times \frac{s}{\sqrt{n}}$
Diferencia absoluta	$ d_i = y_1 - y_0 $



11.3. Resultados de selección de volumen de inyección

Tabla 40. Datos cromatográficos de la selección del volumen de inyección.

Vol. (μL)	tr (min)	Área	Vol./área	%Recobro	Altura	Ancho (s)	Coleo	k'
2.5	2.57	718860	287544	99.5	41582	19	1.21	4.25
2.5	2.73	723310	289324	100.1	41844	20	1.2	4.25
2.5	2.54	728126	291250	100.8	41467	19	1.24	4.26
5	2.6	1440394	288079	99.7	112405	20	1.22	4.24
5	2.6	1434218	286844	99.3	113325	20	1.2	4.26
5	2.6	1426650	285330	98.8	112317	20	1.21	4.27
10	2.59	2879493	287949	99.7	231999	20	1.25	4.26
10	2.59	2851669	285167	98.7	233397	20	1.22	4.26
10	2.6	2906611	290661	100.6	231001	20	1.23	4.28
15	2.59	4281386	285426	98.8	344748	22	1.20	4.26
15	2.6	4288856	285924	99.0	343912	22	1.22	4.27
15	2.61	4293181	286212	99.1	341102	21	1.22	4.28
20	2.6	5813018	290651	100.6	408734	22	1.21	4.28
20	2.57	5717781	285889	98.9	422324	23	1.2	4.30
20	2.57	5782601	289130	100.1	419575	23	1.24	4.32
25	2.6	7272882	290915	100.7	481523	25	1.21	4.30
25	2.58	7228712	289148	100.1	484444	25	1.25	4.35
25	2.57	7299319	291973	101.1	485330	26	1.22	4.29
30	2.56	8564342	285478	98.8	517729	25	1.22	4.38
30	2.57	8571033	285701	98.9	516220	25	1.2	4.30
30	2.58	8527790	284260	98.3	494986	25	1.21	4.31
\bar{x}	2.59	4416678	287755	99.59			1.22	
<i>s</i>	0.04	2792872	2376.75	0.83			0.02	
<i>C.V.</i>	1.40	63.23	0.83	0.83			1.31	



11.4. Resultados de la proporción de la fase móvil y flujo de inyección

Tabla 41. Datos cromatográficos de la selección de fase móvil y flujo.

Condición	tc (min)	Nombre	tr (min)	Área	Altura	Ancho (s)	Rs
FA:ACN (55:45) 0.7 mL/min	4	t-RSV c-RSV	1.90 2.24	202605 238438	41347 45956	14 17	1.29
FA:ACN (55:45) 0.8 mL/min	3	t-RSV c-RSV	1.49 1.72	178262 197660	37390 40208	13 14	1.04
FA:ACN (60:40) 0.7 mL/min	4	t-RSV c-RSV	1.75 2.08	203226 239463	39525 41909	15 19	1.16
FA:ACN (60:40) 0.8 mL/min	4	t-RSV c-RSV	1.74 2.12	182981 208008	36864 38912	16 19	1.28
FA:ACN (65:35) 0.7 mL/min	4	t-RSV c-RSV	2.08 2.67	205952 233961	36428 35815	17 22	1.80
FA:ACN (65:35) 0.8 mL/min	4	t-RSV c-RSV	2.15 2.82	196023 206217	36104 34404	19 21	1.76
FA:ACN (65:35) 0.9 mL/min	4	t-RSV c-RSV	1.88 2.46	181831 185193	35114 32819	21 19	2.01
FA:ACN (70:30) 0.7 mL/min	5	t-RSV c-RSV	2.39 3.53	223595 233586	32216 26802	31 30	2.21
FA:ACN (70:30) 0.8 mL/min	6	t-RSV c-RSV	2.93 4.32	190441 199079	31495 26723	20 24	3.74
FA:ACN (70:30) 0.9 mL/min	5	t-RSV c-RSV	2.70 3.94	176666 179586	29688 25355	27 24	2.91
FA:ACN (75:25) 0.7 mL/min	10	t-RSV c-RSV	5.11 8.78	220721 237298	24880 16890	45 49	4.68
FA:ACN (75:25) 0.8 mL/min	12	t-RSV c-RSV	5.14 8.85	218138 236176	24542 16615	33 48	5.50

tc – tiempo de corrida



11.5. Resultados de la adecuabilidad

Tabla 42. Datos cromatográficos de la adecuabilidad del sistema.

Sistema	[t-RSV] ($\mu\text{g/mL}$)	tr (min)	Área	% Recuperación	Altura	Ancho (s)	N	Coleo	K'
1	4.2	2.63	293343	100.24	43319	30	442.35	1.22	4.26
2	4.2	2.64	292031	99.79	43047	30	445.04	1.21	4.27
3	4.2	2.65	293544	100.31	43344	30	448.76	1.21	4.30
4	4.2	2.65	291910	99.75	42962	30	450.80	1.21	4.31
5	4.2	2.66	292377	99.91	42762	30	453.52	1.23	4.32
6	4.2	2.67	292643	100.00	42844	30	454.88	1.21	4.33
	\bar{x}	2.64	292641	100.00	43046	30	449.23	1.22	4.30
	s	0.01	675.93	0.23	241.60	0.00	4.86	0.01	0.03
	C.V.	0.54	0.23	0.23	0.56	0.00	1.08	0.51	0.67



11.6. Resultados de la linealidad del sistema

Tabla 43. Datos cromatográficos de linealidad del sistema.

Sistema	[t-RSV] µg/mL	tr	Área	Área/[RSV]	Altura	k'	Coleo
1	0.525	2.56	44391	84554.29	7232	4.13	1.20
2	0.525	2.56	44345	84466.67	6674	4.12	1.18
3	0.525	2.56	44361	84497.14	7153	4.12	1.17
4	1.05	2.58	88502	84287.62	13503	4.16	1.20
5	1.05	2.6	88596	84377.14	13493	4.16	1.17
6	1.05	2.6	88538	84321.91	13785	4.19	1.20
7	2.1	2.59	172550	82166.67	25955	4.2	1.18
8	2.1	1.58	172331	82062.38	26364	4.19	1.18
9	2.1	2.55	172499	82142.38	26390	4.17	1.18
10	4.2	2.52	343956	81894.29	54770	4.1	1.20
11	4.2	2.52	343318	81742.38	55436	4.04	1.21
12	4.2	2.55	344238	81961.43	54478	4.04	1.18
13	8.4	2.56	688581	81973.93	112146	4.11	1.18
14	8.4	2.57	684886	81534.05	112396	4.13	1.18
15	8.4	2.56	688587	81974.64	112030	4.12	1.18
16	16.8	2.54	1390918	82792.74	241601	4.08	1.20
17	16.8	2.52	1399481	83302.44	232419	4.03	1.21
18	16.8	2.52	1392882	82909.64	234727	4.04	1.20
	\bar{x}	2.56	455164	82942.32			
	s	0.3	484759.90	1153.97			
	C.V.	1.0	106.5021	1.39			



11.7. Resultados de precisión y exactitud

Tabla 44. Resultados del análisis de porcentaje de recuperación para la exactitud y precisión del método.

% t-RSV teórico	mg MP real	mg t-RSV teóricos	[mg t-RSV/mL] Adicionada	Área de t-RSV	[mg t-RSV/mL] Estimada	% de recuperación de t-RSV	[E]/[A]
80	140.05	70.03	2.8	210337	2.90	103.62	1.03
80	140.00	70.00	2.8	204165	2.82	100.52	1.00
80	140.00	70.00	2.8	200777	2.77	98.80	0.99
80	140.00	70.00	2.8	201781	2.78	99.31	0.99
80	140.04	70.02	2.8	201033	2.77	98.91	0.99
80	140.00	70.00	2.8	209914	2.90	103.44	1.03
100	175.01	87.51	3.5	255367	3.54	101.22	1.01
100	175.00	87.50	3.5	251696	3.49	99.73	0.99
100	175.02	87.51	3.5	249428	3.46	98.80	0.99
100	175.00	87.50	3.5	253857	3.52	100.61	1.00
100	175.00	87.50	3.5	254785	3.53	100.99	1.00
100	175.03	87.52	3.5	254059	3.52	100.67	1.00
120	210.02	105.01	4.2	299830	4.18	99.40	0.99
120	210.04	105.02	4.2	299233	4.17	99.19	0.99
120	210.01	105.01	4.2	297613	4.14	98.65	0.99
120	210.03	105.02	4.2	301663	4.20	100.01	1.00
120	210.02	105.01	4.2	301789	4.20	100.06	1.00
120	210.02	105.01	4.2	298209	4.15	98.85	0.98
					\bar{x}	100.16	1.00
					s	1.47	0.02
					C.V.	1.47	1.47



11.8. Resultados de linealidad del método

Tabla 45. Resultados del análisis de porcentaje de recuperación para la linealidad del método.

% t-RSV teórico	mg MP real	mg t-RSV teóricos	[mg t-RSV/mL] adicionada	Área de t-RSV	[mg t-RSV/mL] estimada	% de recuperación de t-RSV	[E]/[A]
80	140.05	70.03	2.8	210337	2.9025	103.62	1.04
80	140.00	70.00	2.8	204165	2.8147	100.52	1.00
80	140.04	70.02	2.8	200777	2.7665	98.78	0.99
90	157.49	78.75	3.1	227183	3.1420	99.75	0.99
90	157.50	78.75	3.2	229186	3.1705	100.65	1.00
90	157.50	78.75	3.2	226513	3.1325	99.44	0.99
100	175.01	87.51	3.5	255367	3.5428	101.22	1.01
100	175.00	87.50	3.5	251696	3.4906	99.73	0.99
100	175.00	87.50	3.5	249428	3.4583	98.81	0.99
110	192.52	96.26	3.9	278038	3.8652	100.38	1.00
110	192.53	96.27	3.9	276981	3.8502	99.99	0.99
110	192.50	96.25	3.9	276370	3.8415	99.78	1.00
120	210.02	105.01	4.2	301663	4.2011	100.02	1.00
120	210.04	105.02	4.2	301789	4.2029	100.05	1.00
120	210.01	105.01	4.2	298209	4.1520	98.85	0.99
					\bar{x}	100.11	1.00
					s	1.20	0.01
					C.V.	1.19	1.19



11.9. Resultados de repetibilidad y reproducibilidad.

Tabla 46. Resultados del análisis de porcentaje de recuperación para la reproducibilidad y repetibilidad.

Sistema	Día 1		Día 2		Resultado promedio global
	Analista 1	Analista 2	Analista 1	Analista 2	
1	99.83	99.69	99.19	99.69	99.60
2	100.02	99.67	100.05	99.68	99.86
3	99.71	99.34	99.35	99.50	99.48
4	99.83	100.38	99.46	99.37	99.76
5	100.15	100.27	99.58	99.32	99.83
6	100.77	99.71	100.23	99.26	99.99
\bar{x}	100.05	99.85	99.64	99.4716	99.7431
s	0.39	0.40	0.41	0.19	0.4010
<i>C.V.</i>	0.39	0.40	0.41	0.19	0.4021
N	6.0	6.0	6.0	6.0	24.0000
\sqrt{N}	2.45	2.45	2.45	2.45	4.8990
g. l.	5.0	5.0	5.0	5.0	23.0000
t	4.30	4.30	4.30	4.30	4.3027
s/r^2	0.16	0.16	0.17	0.08	0.0819
s	0.68	0.70	0.72	0.33	0.3522
Lim S	100.73	100.55	100.36	99.80	100.10
Lim I	99.38	99.15	98.92	99.15	99.39



11.1. Resultados de robustez

Tabla 47. Resultados del análisis de porcentaje de recuperación para la robustez del método.

Factor	Volumen de inyección			Fase Móvil			pH de Fase Móvil FA		
	10 µL	9 µL	11 µL	FA: ACN (70:30)	FA: ACN (69:31)	FA: ACN (71:29)	pH=4	pH=3	pH=5
Área	337872	305091	376796	326285	340704	344321	276015	290916	283767
Área	335873	304030	377060	331344	339070	344918	276482	294231	282752
Área	337476	304883	377120	330664	340758	343344	274579	296664	283016
Área	337550	304003	377064	327151	339305	343006	274695	293016	282470
Área	333468	304799	377556	333403	337330	345348	273630	292340	280866
Área	336320	305017	377328	326849	336590	346584	273345	296795	281990
%Recuperación	100.62	100.16	99.86	99.13	100.88	99.81	100.45	98.95	100.46
%Recuperación	100.03	99.81	99.93	100.67	100.39	99.98	100.62	100.08	100.10
%Recuperación	100.51	100.09	99.95	100.46	100.89	99.53	99.92	100.91	100.19
%Recuperación	100.53	99.80	99.93	99.40	100.46	99.43	99.97	99.67	100.00
%Recuperación	99.31	100.06	100.06	101.30	99.88	100.11	99.58	99.44	99.43
%Recuperación	100.16	100.13	100.00	99.31	99.66	100.46	99.47	100.95	99.83
\bar{x}	100.19	100.01	99.96	100.05	100.36	99.89	100.00	99.99	100.00
S	0.49	0.16	0.07	0.89	0.51	0.38	0.46	0.81	0.35
C.V.	0.49	0.16	0.07	0.89	0.51	0.39	0.46	0.81	0.35
N	6	6	6	6	6	6	6	6	6
\sqrt{N}	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45
g.l.	5	5	5	5	5	5	5	5	5
t	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30
s/r2	0.20	0.07	0.03	0.36	0.21	0.16	0.19	0.33	0.14
s	0.86	0.28	0.12	1.56	0.89	0.68	0.80	1.42	0.61
Lim S	101.05	100.29	100.08	101.60	101.25	100.56	100.80	101.42	100.61
Lim I	99.33	99.73	99.84	98.49	99.47	99.21	99.20	98.58	99.39
	 di < 2.0	0.18	0.24	 di < 2.0	0.32	0.16	 di < 2.0	0.00	0.00



Tabla 47. Resultados del análisis de porcentaje de recuperación de t-RSV para la robustez del método (Continuación).

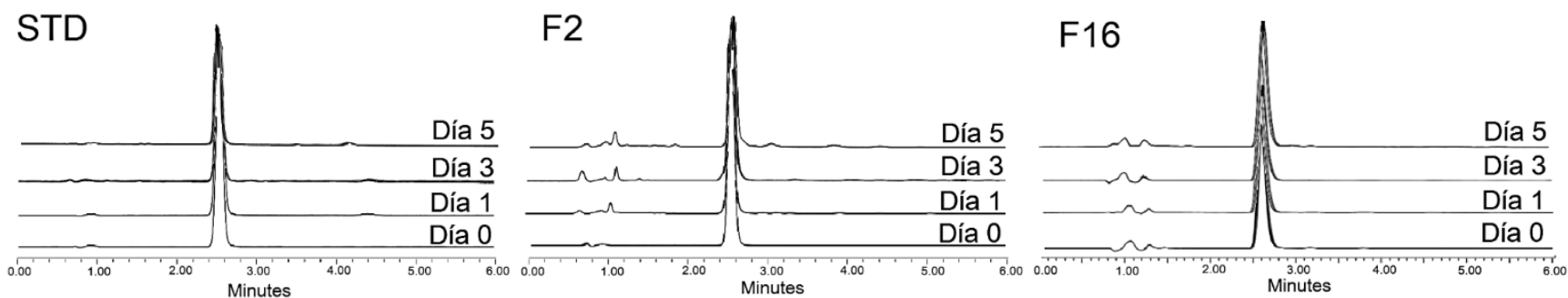
Factor	No. De serie de la columna			Equipo	
	W23331X 020	W22121V 041	W32581T 016	HPLC	UPLC
Área	335487	347397	351744	278907	320370
Área	326290	344802	353227	277783	320156
Área	332453	339424	352148	277294	318866
Área	334670	345582	356842	278273	318404
Área	335509	345319	358999	279436	319449
Área	336155	337217	353755	279302	319627
%Recuperación	100.62	101.20	99.24	100.15	100.29
%Recuperación	97.86	100.44	99.65	99.74	100.22
%Recuperación	99.71	98.87	99.35	99.57	99.82
%Recuperación	100.37	100.67	100.67	99.92	99.67
%Recuperación	100.62	100.59	101.28	100.34	100.00
%Recuperación	100.82	98.23	99.80	100.29	100.06
\bar{x}	100.00	100.00	99.99	100.00	100.00
S	1.12	1.17	0.81	0.31	0.24
C.V.	1.12	1.17	0.81	0.31	0.24
N	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
\sqrt{N}	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45
g.l.	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
t	4.30	4.30	4.30	4.30	4.30
s/r2	0.46	0.48	0.33	0.13	0.10
s	1.96	2.05	1.42	0.54	0.41
Lim S	101.96	102.05	101.42	100.54	100.42
Lim I	98.04	97.95	98.58	99.46	99.59
	 di < 2.0	0.00	0.00	 di < 2.0	0.01



11.2. Resultados del ensayo de estabilidad.

11.2.1. Cromatogramas de degradación forzada por hidrólisis

Temperatura 40° C



Temperatura 60° C

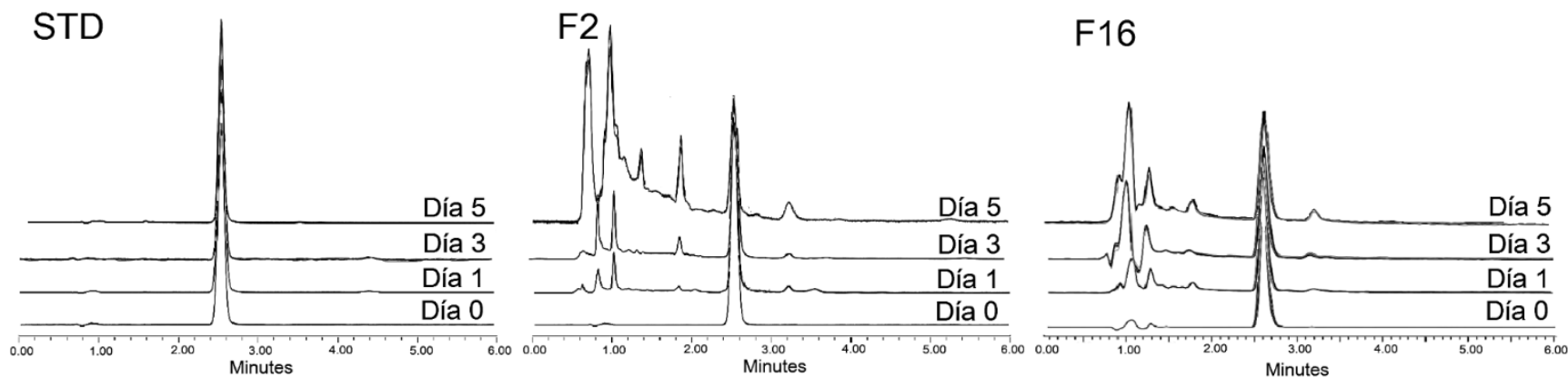




Figura 35. Comparación de cromatogramas de Formulación control por día.

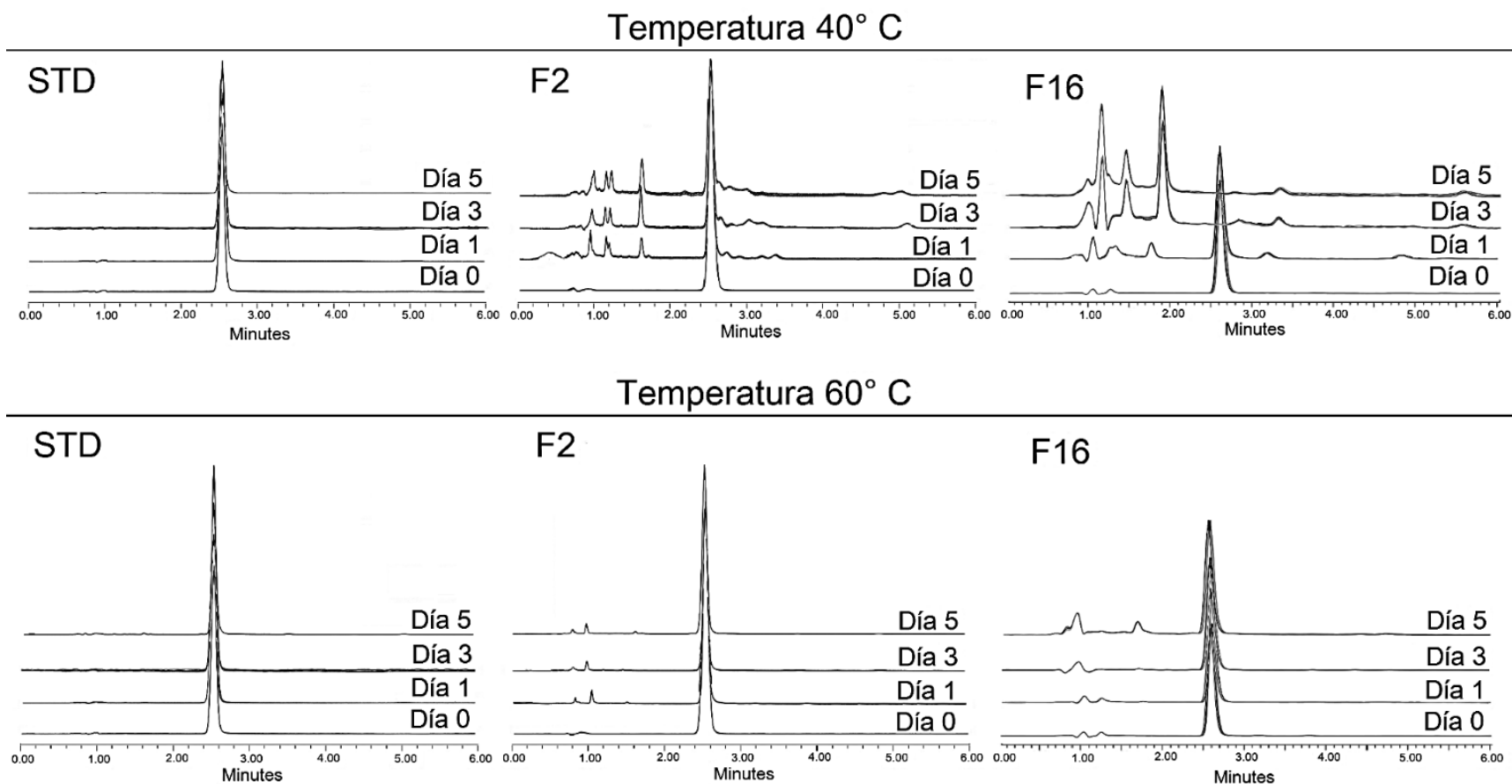
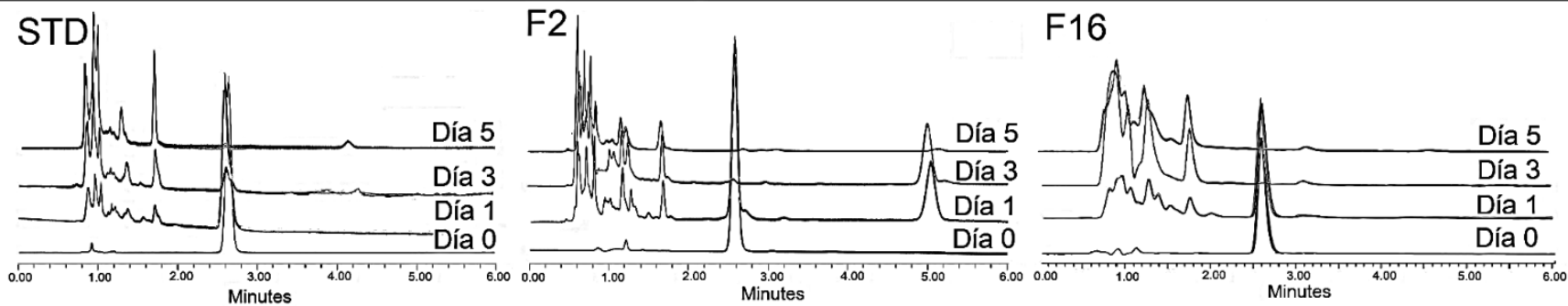


Figura 36. Comparación de cromatogramas de HCl 0.1 N por día.



Temperatura 40° C



Temperatura 60° C

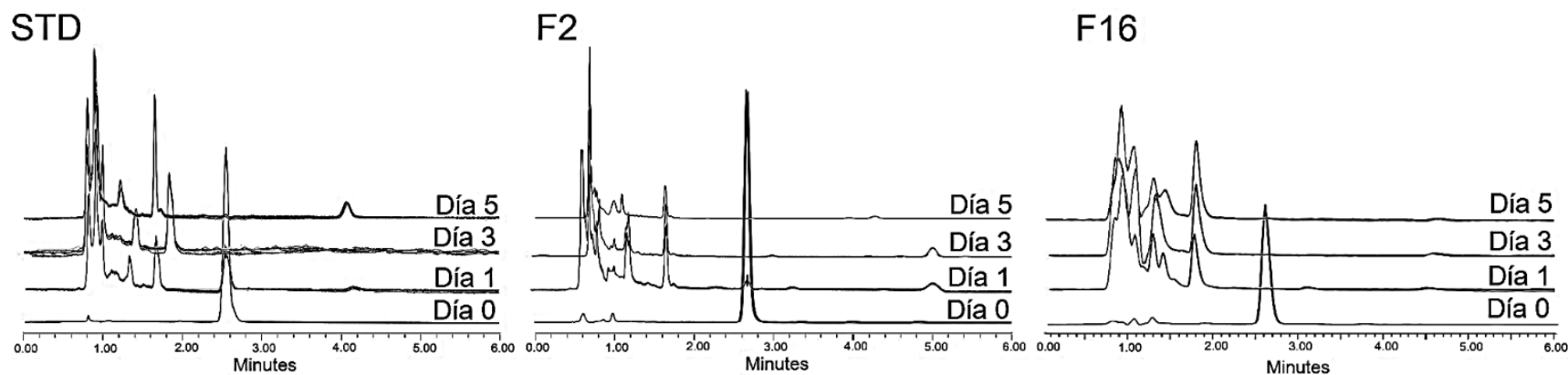


Figura 37. Comparación de cromatogramas de NaOH 0.1 N por día.



11.2.2. Cromatogramas de degradación forzada por oxidación

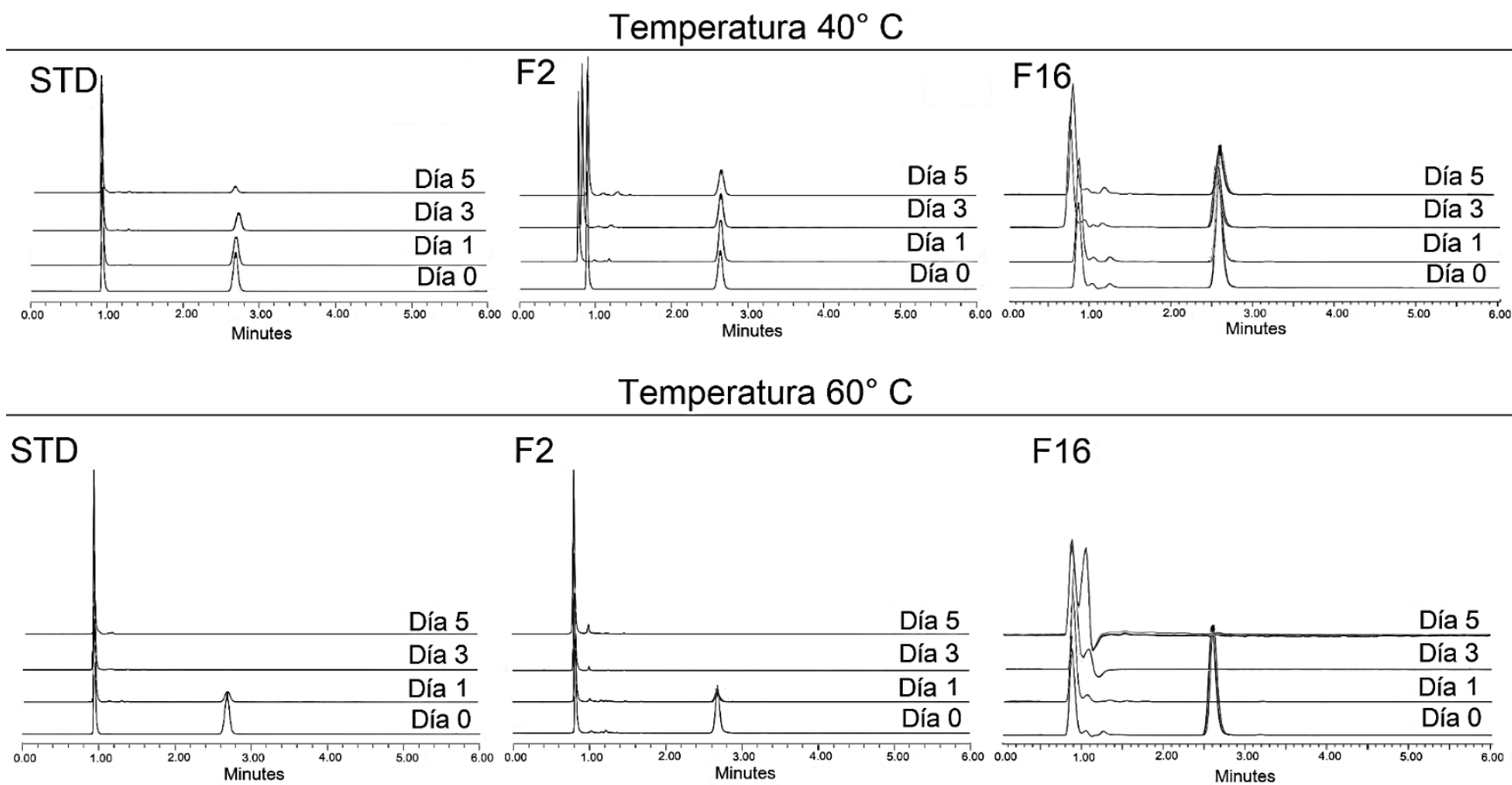


Figura 38. Comparación de cromatogramas de H₂O₂ 3% por día.



11.2.3. Cromatogramas de degradación forzada térmica

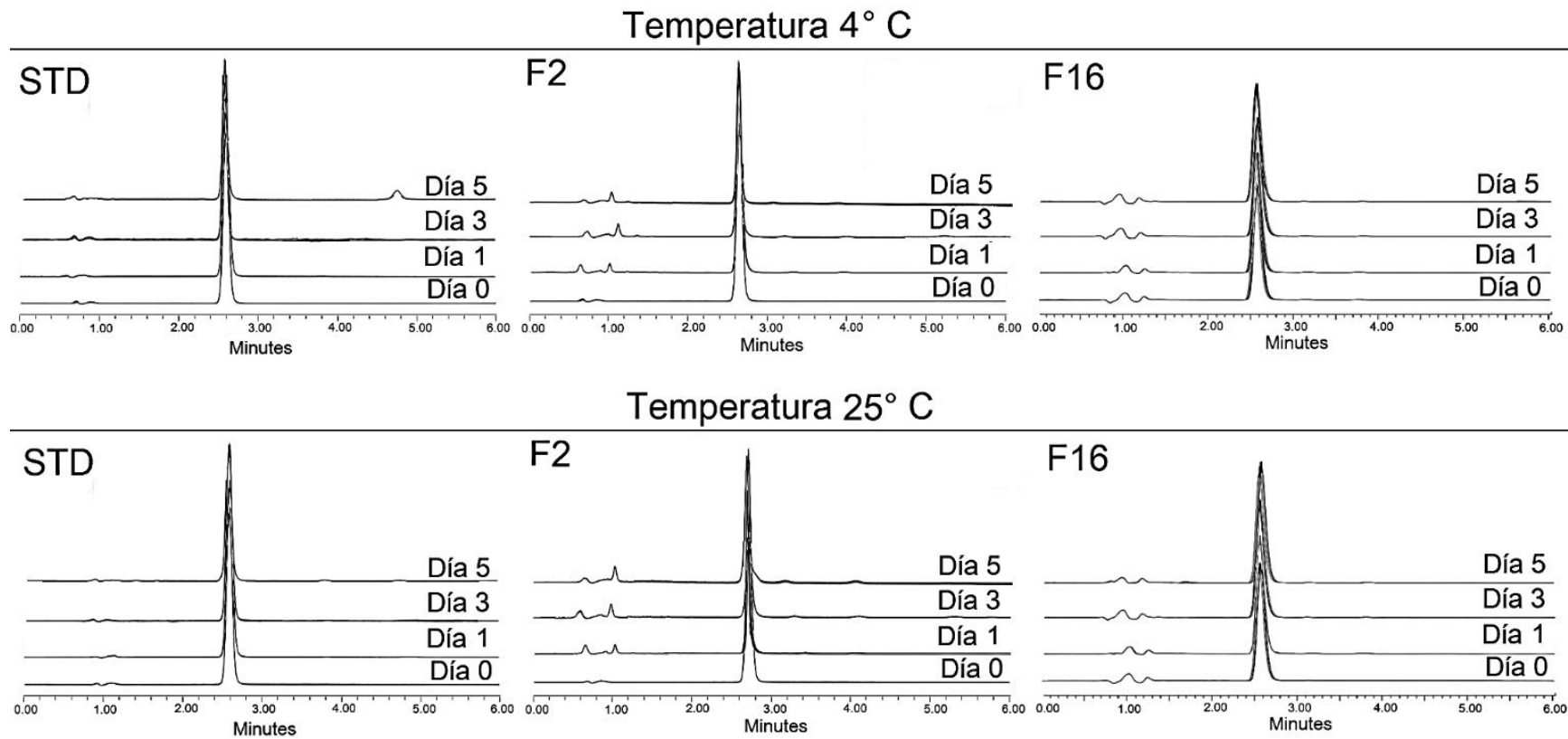
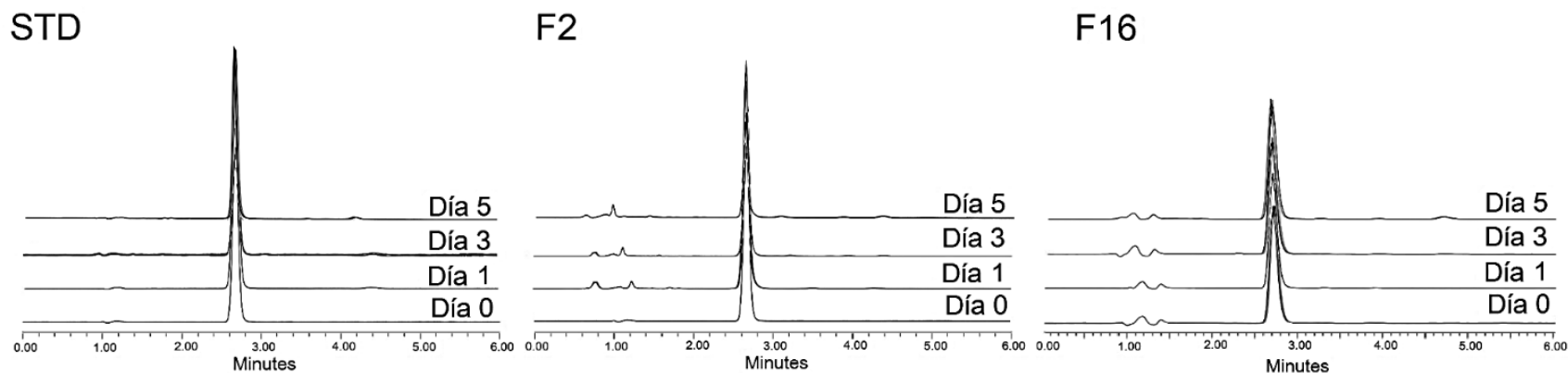


Figura 39. Comparación de cromatogramas de 4° y 25° C por día.



Temperatura 40° C



Temperatura 60° C

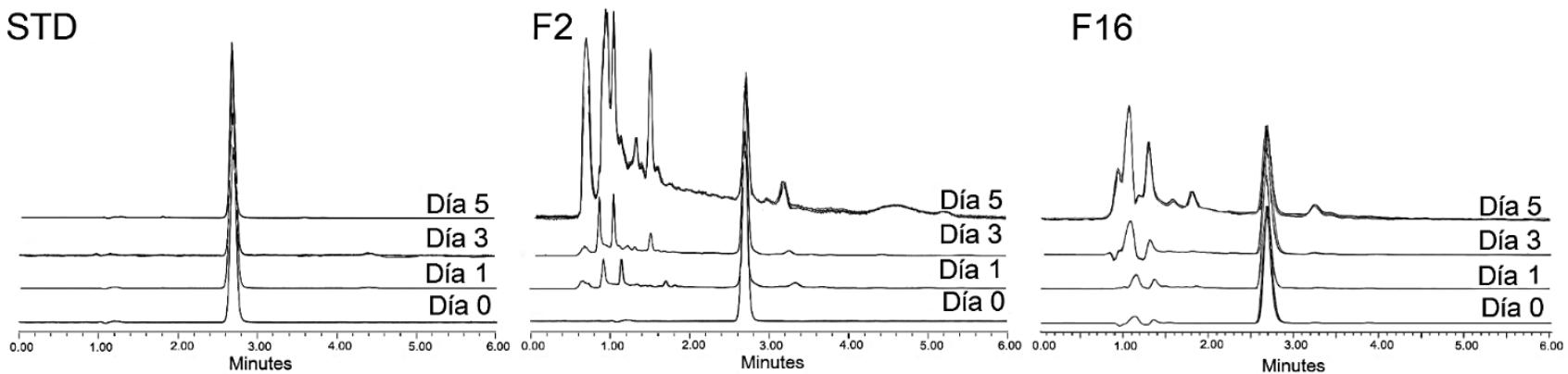


Figura 40. Comparación de cromatogramas de 40° y 60° C por día.



11.2.4. Cromatogramas de degradación forzada por fotólisis

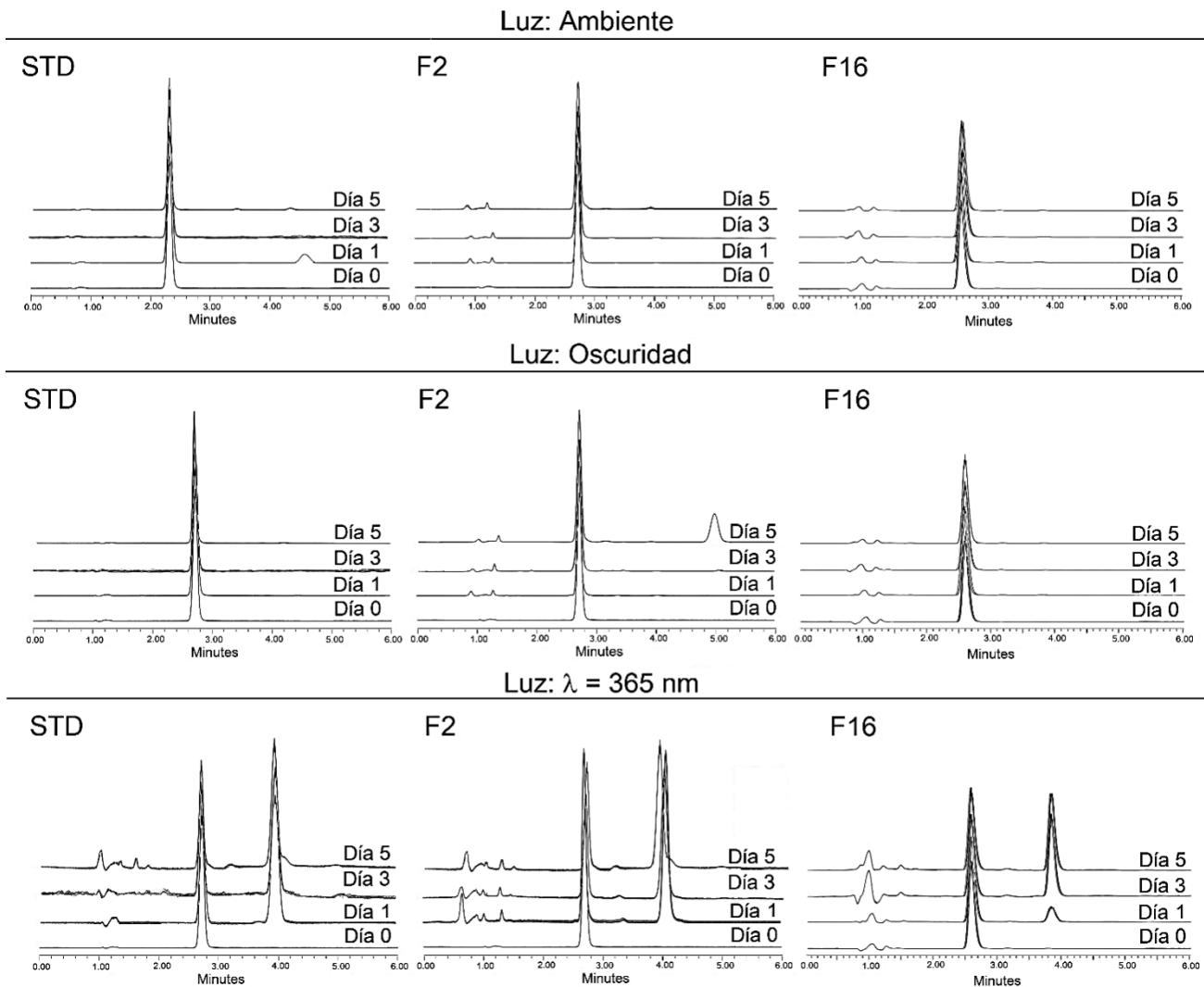


Figura 41. Comparación de cromatogramas de fotólisis por día